

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Identificación de los mecanismos moleculares involucrados en la
morfogénesis de *Cryptococcus neoformans* y estudio de su función
durante la infección**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria Trevijano Contador

Director

Óscar Zaragoza Hernández

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA MORFOGÉNESIS DE *Cryptococcus neoformans* Y
ESTUDIO DE SU FUNCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN

TESIS DOCTORAL

NURIA TREVIJANO CONTADOR

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA MORFOGÉNESIS DE *Cryptococcus neoformans* Y
ESTUDIO DE SU FUNCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN

TESIS DOCTORAL

NURIA TREVIJANO CONTADOR

Madrid, 2016

Director:

Dr. Óscar Zaragoza Hernández

Científico titular del Centro Nacional de Microbiología

A mis padres

Agradecimientos

Sin lugar a duda, este es el apartado de esta tesis doctoral que menos me ha costado escribir, representa el fin de una etapa que ha significado muchísimo para mí. Son muchas las personas que durante los últimos cuatro años me han mostrado su apoyo y cariño y a los que quisiera dedicar unas palabritas para demostrarles mi gratitud.

En el lugar de honor y como no podía ser de otra manera, quisiera agradecer a Óscar Zaragoza, mi director de tesis, su apuesta por mí, la confianza, el apoyo, tanto y tanto tiempo dedicado a mi enseñanza, la motivación, todas las oportunidades ofrecidas y el entusiasmo que me ha transmitido a lo largo de este camino. Nos entendimos muy bien desde el principio y por eso me quedo con esta relación envidiable que tenemos y que estoy segura se mantendrá a lo largo del tiempo. Por último, un gracias muy especial, por el cariño recibido en la distancia en un momento muy duro para mí.

A Manuel Cuenca-Estrella, por ser el primero que me dio la oportunidad de formar parte del Servicio de Micología hace ya 5 años. Madridista sí, pero que le vamos hacer...Muchas gracias.

A Emilia (Emi), por todos los consejos, las palabras de apoyo, la preocupación, las cenitas, la Tape y como no las tardes por los pasillos de Ikea tocándolo todo pero todo, no nos hemos dejado nada pero seguro que volveremos ;) Gracias por todo y sobre todo tu amistad.

A Ana C y Cris R, que me han soportado durante todo este tiempo, me han animado y mostrado su cariño en los momentos de bajón y compartido risas en los buenos momentos (que han sido muchos). Muchas gracias por vuestra paciencia y amistad. Os quiero.

A mi querido “doctoranders” (Roci, Clara, Olga y Sue). Estos dos últimos años no habrían sido iguales sin compartirlos como vosotras. Clari lleva aguantándome un poquito más ya que comenzamos esta aventura juntas lo cual fue una suerte. A Roci, que no le entré por los ojos al principio pero que al final me la he ganado ;). Gracias por tu apoyo. A mi swimmer preferida (Olga), ese gym nos unió muchísimo y te convirtió en alguien muy importante para mí. Muchas gracias por los momentos compartidos, y por ese viajecito a Perugia que fue una inyección de energía. A Sue (que puedo decirte Sue que no sepas ya...). Para ti, la medalla de oro a la paciencia. Que valor al compartir despacho conmigo y sobre todo estos últimos meses. Te adoro porque eres genial. Gracias por hacer más llevadero los “sabéis qué puede ser muy interesante” de Óscar y por todo, no puedo especificar porque es todo. OS QUIERO CHICAS.

A Leticia y Macamoa. Leti que eres muy grande, mucho más de lo que tú piensas. Gracias por estar siempre para mí y por esas charlitas tan reconfortantes para las dos (vaya desahogos nos hemos pegao). A mi “equipo”, porque eres una “loca controlada” de la que he aprendido muchísimo y con la que es imposible no reírse. Me llevo dos amigas para siempre. Gracias.

A Laura y Mariajo, a las que admiro muchísimo como investigadoras pero mucho más como personas. A Mariajo, por su saber estar y aportar tranquilidad. A Lau, por estar siempre dispuesta a ayudarme y por los consejos. Gracias.

A Alicia y Araceli, por todos los desayunos compartidos llenos de buenos momentos. A Ali, por tener siempre un momento para mí, ha sido un placer trabajar contigo. A Araceli, a la que echaré de menos controlando los registros y buscando tus queridas pipetas. Gracias.

A Ana A, Teresa y Cris A, por sacar siempre un momentito para ayudarme y por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del labo. Gracias.

A Gema, Susana, Cris C, Ana B y Charo. De todas he aprendido algo durante estos cuatro años. Gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme y por más de una risa compartida en el laboratorio.

A las personas que ya no forman parte del Servicio pero con los que he coincidido en algún momento de esta tesis. Rocío, Sara, Luis y Emilio, con una especial mención a Rocío, que me ayudó mucho al inicio en el laboratorio y con la que siempre es un placer volver a coincidir. Gracias a todos.

Al laboratorio de Serología, Fernando de Ory, Jesús, Teo, Pilar y Lala. Porque vuestro laboratorio siempre ha sido como un refugio para mí, donde los consejos, el cariño, el apoyo y los ánimos nunca me han faltado. Muchísimas gracias.

A Joaquín Ariño, por toda su ayuda en el análisis del RNAseq y por tener siempre un ratito para resolver mis dudas. Gracias.

Al Departamento de Microbiología II de la UCM, a Jesús Pla, Inés, Rebeca y Elvira que tanto me han ayudado en una parte muy importante de este Proyecto. Muchas gracias.

I would like to say thank you very much to Arturo Casadevall for always being approachable from the very beginning. Also to all his lab members, especially to Rafa, Antonio, Johanna and Julie for all your time and support during my stay in your lab. Thank you very much to Liise-anne Pirofski as well, for giving me the chance to participate in her project. It was a pleasure working with all of you.

Io vorrei ringraziare Anna Vecchiarelli e tutto il suo gruppo di ricerca in particolare Elena Roselletti per avermi fatto sentire a casa. Grazie mille a tutti.

A mis padres, a los que dedico esta tesis y mi gran ejemplo a seguir. A mi madre, a la que adoro y admiro como a nadie, por la perseverancia, la lucha, la sabiduría, la elegancia y la pasión en todo lo que hace. Es un honor que me digan que me parezco a ti. A mi padre, por el trabajo, la fuerza, el humor y esa forma de tomarse la vida que tanto me ha gustado siempre. Gracias por el apoyo incondicional y por dárme todo. Os quiero muchísimo.

A Carol, mi hermana mayor y pequeña al mismo tiempo. Primero mi compañera de juegos, después aliada y por último amigas (la mejor que tengo). Siempre tendrás mi admiración y ahora más que nunca estoy muy orgullosa de ti.

A Alberto, el gran amor de vida y mi momento favorito de cada día. Por escucharme hablar de *Cryptococcus* y células gigantes con paciencia, por apoyarme a irme fuera y seguir creciendo y por aportarme esa calma y tranquilidad que tanto me falta. Gracias por hacerme llegar tu amor en la distancia. Nuestro proyecto juntos es el más bonito en el que he trabajado nunca. Te quiero.

A María (Zo), por esa amistad desde siempre y para siempre. Sabes que tienes un sitio especial en mi corazón. Gracias por el diseño de esta tesis (que tiene ese toque único y especial como tú). Muchas gracias.

A Cris, Lala, Teresa, Patri, Vir, Almu y Ana P. Por vuestra amistad y porque todas me habéis aportado algo que me hace ser como soy. Compartir con vosotras mi vida es algo increíble y me siento muy afortunada. Gracias y os quiero.

A todos mis amigos “chupipandi”, porque es una auténtica suerte poder contar siempre con todos ellos, con una especial mención a mi amigo Pablo por sus cariñosos apodos y su increíble interés por mi trabajo. Muchísimas gracias a todos.

Y por último, me dedico unas palabras a mí misma ya que ha supuesto un gran reto personal, en el que he dado el máximo. He superado todas mis expectativas y me siento muy orgullosa del resultado obtenido. He pasado verdaderos momentos de agobio durante las estancias y algún que otro congreso pero al final he salido airoso y sobre todo sabiendo un poquito más. Me dedico un “olé”.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Importancia de los hongos patógenos.....	3
1.2 Papel de la respuesta inmune en el desarrollo de infecciones fúngicas invasoras	3
1.3 Factores del hongo que contribuyen a la enfermedad	4
1.3.1 Factores que causan daño en el huésped.....	4
1.3.2 Adaptación a condiciones del huésped	5
1.3.3 Morfogénesis fúngica.....	5
1.3.3.1 Hongos que cambian de forma durante la infección. El caso de <i>Candida albicans</i> ..	6
1.3.3.1.1 Importancia de las hifas en la virulencia	6
1.3.3.2 Hongos que no cambian de forma durante la infección	7
1.3.3.2.1 <i>Candida glabrata</i> y hongos dimórficos.....	7
1.3.3.3 Hongos que cambian de tamaño durante la infección: <i>Cryptococcus</i>	8
1.4 <i>Cryptococcus</i> y criptococosis: introducción a su biología	8
1.4.1 Clasificación y nomenclatura.....	9
1.4.2 <i>Cryptococcus neoformans</i> ; incidencia, epidemiología y enfermedad.	10
1.4.3 <i>Cryptococcus</i> como patógeno intracelular facultativo.....	11
1.5 Cápsula.....	12
1.5.1 Composición de la cápsula	12
1.5.2 Síntesis de la cápsula	13
1.5.3 Otros factores de virulencia: Melanina y ureasa.....	14
1.6 Morfogénesis en <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
1.6.1 Cambios de tamaño de la cápsula	15
1.6.2 Formación de células gigantes.....	17
1.6.2.1 Factores que favorecen la formación de células gigantes.....	17
1.6.2.1.1 Rutas implicadas en la formación de células gigantes.....	17
1.6.2.1.2 Factores del huésped involucrados en la formación de células gigantes	18
1.7 Respuesta inmune frente a <i>C. neoformans</i>	18
1.7.1 Papel de la respuesta innata frente a <i>C. neoformans</i>	19
1.7.1.1 Respuesta humoral: complemento y péptidos antimicrobianos.....	19
1.7.1.2 Respuesta celular: macrófagos, neutrófilos y células dendríticas	20
1.7.2 Papel de la respuesta adaptativa	21
1.7.2.1 Respuesta humoral: anticuerpos y citoquinas.....	21
1.7.2.2 Respuesta celular: linfocitos B y T	22

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
3.1 Microorganismos y técnicas microbiológicas	29
3.1.1 Cepas de <i>Cryptococcus</i>	29
3.1.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	29
3.1.3 Crecimiento en medio sólido	30
3.1.4 Técnicas microbiológicas	31
3.1.4.1 Curvas de crecimiento	31
3.1.4.2 Fijación de células	31
3.2 Tinciones.....	31
3.2.1 Tinción negativa con tinta china	31
3.2.1.1 Medida del tamaño celular y capsular.....	31
3.2.2 Tinción de la pared celular con calcofluor	32
3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta de la cápsula	32
3.3 Inhibidores de la fosforilación oxidativa	32
3.3.1 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial.....	33
3.4 Obtención de células gigantes para realizar la secuenciación masiva del ARN (RNAseq) <i>in vitro</i> y condiciones de elutriación	33
3.5 Extracción de lípidos polares.....	35
3.5.1 Purificación y efecto de fosfolípidos polares del suero en la formación de células gigantes.....	36
3.5.2 Evaluación del efecto del Farnesol en la formación de células gigantes	36
3.5.3 Visualización de la formación de células gigantes en tiempo real	36
3.6 Modelos de interacción con el huésped.....	37
3.6.1 Modelo de ratón	37
3.6.1.1 Cepas de ratón	37
3.6.1.2 Anestesia.....	37
3.6.1.3 Preparación de inóculo e infección intranasal	37
3.6.1.4 Seguimiento del bienestar animal y sacrificio.....	38
3.6.1.5 Extracción de órganos y aislamiento de las células de <i>C. neoformans</i> a partir de los pulmones.....	38
3.6.1.6 Extracción de sangre y obtención de suero	39
3.6.1.7 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFCs).....	39
3.6.1.8 Estudio de la morfología fúngica.....	39
3.6.1.9 Histología	40
3.6.1.10 Medida de la concentración de citoquinas en pulmón y cerebro	40
3.6.1.11 Medida de anticuerpos anti-GXM en suero	40

3.6.1.12 Determinación de la concentración total de IgE en suero	41
3.6.1.13 Identificación de diferentes tipos de células inmunes.....	41
3.6.2 Líneas celulares.....	42
3.6.3 Cultivos celulares.....	43
3.6.4 Fagocitosis <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales primarios.....	43
3.6.5 Fagocitosis <i>in vitro</i> con macrófagos RAW 264.7	43
3.6.6 Modelo de <i>Galleria mellonella</i>	44
3.6.6.1 Infección de <i>G. mellonella</i>	44
3.6.6.2 Experimentos de supervivencia	44
3.6.6.3 Fagocitosis <i>in vivo</i>	45
3.7 Técnicas de citometría de flujo	45
3.7.1 Análisis de la viabilidad celular.....	45
3.7.2 Análisis de tamaño celular mediante citometría de flujo	45
3.8 Técnicas de biología molecular	46
3.8.1 Obtención de ADN	46
3.8.3 Iniciadores	47
3.8.4 PCR en tiempo real.....	47
3.8.5 Preparación de muestras para secuenciación masiva del ARN	48
3.9 Técnicas de bioinformática.....	49
3.10 Análisis estadístico.....	50
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Estudio de la dinámica de la cápsula de <i>C. neoformans</i>	53
4.1.1 Síntesis de la cápsula	53
4.1.2 Crecimiento de la cápsula.....	55
4.1.1.1 Evaluación de la inhibición de la cadena respiratoria en el crecimiento capsular	55
4.1.1.1.1 Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre el crecimiento y la viabilidad celular.....	55
4.1.1.1.2 Efecto de inhibidores específicos de la cadena respiratoria de electrones en la inducción de la cápsula de <i>C. neoformans</i>	57
4.1.1.1.3 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial durante la inducción de la cápsula.....	58
4.1.2.1 Características morfológicas de la cepa mutante <i>gat201</i>	59
4.1.2.2 Estudio de la virulencia del mutante <i>gat201</i> en <i>Galleria mellonella</i>	60
4.1.2.3 Efecto del crecimiento de la cápsula en la virulencia en el modelo de <i>G. mellonella</i>	61
4.1.2.4 Efecto de la inducción de la cápsula en la fagocitosis durante la infección	62
4.1.2.5 Capacidad de replicación del mutante <i>gat201</i> en el interior de los macrófagos	63

Indice

4.2	Estudio de la formación de células gigantes de <i>C. neoformans in vitro</i>	64
4.2.1	Caracterización de los factores que influyen en la formación de células gigantes <i>in vitro</i>	65
4.2.2	Curvas de crecimiento en medio inductor de células gigantes	68
4.2.3	Visualización del aumento del cuerpo celular durante la formación de células gigantes <i>in vitro</i> mediante microscopía en tiempo real	69
4.2.4	Influencia de la densidad celular en la formación de células gigantes	69
4.2.5	Efecto del farnesol en la formación de células gigantes <i>in vitro</i>	70
4.2.6	Efecto de los fosfolípidos procedentes del suero bovino fetal sobre el aumento del tamaño celular	72
4.2.7	Estudio de la formación de células gigantes en diferentes serotipos de <i>C. neoformans</i>	72
4.2.8	Relación entre el tipo de alelo sexual (MAT) y la formación de células gigantes	74
4.2.9	Caracterización de diferentes mutantes en la formación de células gigantes <i>in vitro</i>	75
4.2.10	Caracterización de mutantes de rutas implicadas en la formación de células gigantes.....	76
4.3	Estudio de genes que se inducen durante la formación de células gigantes	77
4.3.1	Análisis de expresión génica en células gigantes obtenidas <i>in vitro</i>	77
4.3.2	Análisis de expresión génica en células gigantes obtenidas <i>in vivo</i>	79
4.3.3	Identificación de genes que se inducen durante la formación de células gigantes <i>in vivo</i>	82
4.3.4	Comparación de la expresión génica en células gigantes obtenidas <i>in vitro/in vivo</i> .	84
4.4	Influencia del huésped en la formación de células gigantes de <i>C. neoformans in vivo</i>	86
4.4.1	Caracterización de células gigantes en diferentes tipos de ratón	86
4.4.1.1	Estudio de la morfología de <i>C. neoformans</i> en ratones CD1 y C57BL/6J	86
4.4.1.2	Efecto de la formación de células gigantes en la susceptibilidad a la infección.....	88
4.4.1.3	Evaluación del peso y de la carga fúngica en pulmones y cerebro	88
4.4.1.4	Estudio del patrón de citoquinas acumulado en el pulmón en los modelos de ratón CD1 y C57BL/6J.....	90
4.4.1.5	Respuesta de anticuerpos durante de la infección por <i>C. neoformans</i> en CD1 y C57BL/6J	92
4.4.2	Función de la IL-17 en la formación de células gigantes de <i>C. neoformans</i>	92
4.4.2.1	Estudio de la morfología de <i>C. neoformans</i> en los modelos de ratón C57BL/6J e <i>Il17a</i> ^{-/-}	93
4.4.2.2	Análisis del peso de los órganos diana durante la infección de <i>C. neoformans</i>	95

4.4.2.3	Histopatología de los pulmones infectados.....	95
4.4.2.4	Correlación de la morfología de <i>C. neoformans</i> con la diseminación al sistema nervioso central.....	96
4.4.3	Estudio de de la respuesta inmune durante la infección de <i>C. neoformans</i> en ratones <i>Il17a^{-/-}</i>	97
4.4.3.1	Análisis de la producción de citoquinas durante la infección.....	97
4.4.3.1.1	Citoquinas en el pulmón.....	98
4.4.3.1.2	Citoquinas en el cerebro.....	99
4.4.3.1.3	Reclutamiento celular en pulmones y cerebro.....	100
5	DISCUSIÓN.....	105
5.1	Síntesis de cápsula y crecimiento capsular.....	105
5.2	Obtención de células gigantes en condiciones <i>in vitro</i>	108
5.2.1	Factores del medio TCM que favorecen las células gigantes.....	109
5.2.2	Otros factores que influyen en la inducción de células gigantes.....	113
5.3	Expresión de genes durante la formación de células gigantes.....	114
5.4	Influencia del huésped en la formación de células gigantes.....	117
5.4.1	Papel de la IL-17 en la morfogénesis de <i>C. neoformans</i>	120
6	CONCLUSIONES.....	125
7	REFERENCIAS.....	129
	PUBLICACIONES	157

Abreviaturas

A

AH	Ácido hialurónico
AA	Ácido araquidónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPs	Péptidos antimicrobianos (<i>antimicrobial peptides</i>)
APC	Células presentadoras de antígeno (<i>antigen presenting cells</i>)
Abs	Anticuerpos
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Cultures Collection</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ATP	Adenosín trifosfato
AOX	Ruta oxidasa alterntiva

B

BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina

C

CD	Células dendríticas
Cq	Ciclos de cuantificación
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CBS	Central Bureau voor Schimmelcultures

D

D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido

DG	Diacilglicerol
-----------	----------------

E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)

F

FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
------------	--

G

GXM	Glucuronoxilomanano
GXMGal	Glucuronogalactoxilomanano
GalXM	Galactoxilomanano
G	gravedades

H

HAART	Terapia antirretroviral de alta actividad (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
H	horas

I

IRIS	Síndrome inflamatorio de reconstitución inflamatoria (<i>Immune reconstitution inflammatory syndrome</i>)
IL	Interleuquina
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
gM	Inmunoglobulina M
IgE	Inmunoglobulina E

K

KCN	Cianuro potásico (potassium cyanide)
KO	Inactivación génica (<i>knockout</i>)
Kg	Kilogramo

Abreviaturas

M

MA s	Macrófagos alveolares
MAPK s	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MBL	Lectina de unión a manosas (<i>Mannose-binding lectin</i>)
mAbs	Anticuerpos monoclonales
mL	Mililitro
min	Minutos
μL	Microlitro
μm	Micras
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mg	Miligramo

N

ns	No significativo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>next-generation sequencing</i>)

P

PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pg	Picogramo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
Δψ_m	Potencial de membrana mitocondrial
PMNs	Células polimorfonucleares
PAR	Ruta respiratoria paralela
PKC	Proteína quinasa C

Q

QS	<i>Quorum sensing</i>
-----------	-----------------------

R

RT-PCR	PCR en tiempo real (<i>real time PCR</i>)
®	Marca registrada
RPKM	Lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i>)

RNAseq	Secuenciación ARN (<i>RNA sequencing</i>)
---------------	---

RE	Retículo endoplasmático
-----------	-------------------------

S

SHAM	Ácido acetilhidrosamina
Sab	Sabouraud
SNC	Sistema Nervioso Central
SDS	Dodecil sulfato sódico

T

TCM	Medio inductor de células gigantes (<i>Titan Cells Medium</i>)
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
Th17	Linfocitos T helper 17
TOR	Diana de Rapamicin (<i>Target of Rapamycin</i>)

U

UFCs	Unidades formadoras de colonias
-------------	---------------------------------

V

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
------------	--------------------------------------

Y

YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
------------	----------------------------

Resumen

Una de las principales características de la mayoría de los hongos es la capacidad de cambiar de morfología. En el caso de hongos patógenos, estos cambios ocurren durante la infección y juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Las transiciones morfológicas pueden ocurrir por formación de hifas y pseudohifas, o por un crecimiento masivo de la blastoconidia. *Cryptococcus neoformans* es una levadura patógena cuya principal característica es una cápsula de polisacárido. Durante la infección, esta levadura cambia de tamaño sin modificar la forma de la célula. En concreto, este hongo puede incrementar su tamaño mediante dos mecanismos diferentes: aumentando el tamaño de la cápsula, o incrementando el diámetro tanto de la cápsula como del cuerpo celular, dando lugar a células gigantes (diámetro mayor de 30 micras). El principal objetivo de este trabajo es investigar los mecanismos que regulan la morfogénesis en *C. neoformans*, e intentar esclarecer los factores del huésped que inducen estos cambios.

En la primera parte de este trabajo, se evaluó la síntesis de la cápsula utilizando una cepa que expresa el gen *CAP59* (necesario para la síntesis capsular), fusionado al promotor regulable *GAL7*. La síntesis de la cápsula se produjo de manera dispersa y no polarizada. Además, se estudió si el incremento capsular era dependiente de la actividad mitocondrial utilizando para ello inhibidores de la fosforilación oxidativa. Observamos que este fenómeno no ocurría en presencia de inhibidores de los diferentes complejos de la cadena transportadora de electrones como antimicina A, ácido salicilhidroxámico o rotenona. Los resultados obtenidos han mostrado nuevos aspectos sobre la dinámica de aparición y crecimiento de la cápsula y abren nuevas vías de investigación necesarias para entender mejor la biología de la cápsula.

La formación de células gigantes es otro cambio morfológico característico de *C. neoformans* durante la infección. Sin embargo, poco se conoce sobre el crecimiento de estas células en condiciones *in vitro*. En este trabajo, mostramos diferentes condiciones que favorecen la formación de células gigantes *in vitro*. Observamos que *C. neoformans* indujo células gigantes en medios limitantes en nutrientes a pH neutro suplementado con suero bovino fetal. Además, otros factores como la azida de sodio, limitación de oxígeno y una atmósfera enriquecida con CO₂ favorecieron dicho cambio morfológico. La formación de células gigantes está regulada por fenómenos de *quorum sensing*, ya que solo se observó a densidades celulares bajas.

Además, quisimos investigar la expresión génica en las células gigantes mediante la secuenciación masiva del ARN (RNAseq) tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Por medio de un análisis comparativo de los resultados obtenidos de ambas condiciones, se

Resumen

obtuvo una coincidencia de 80 genes sobreexpresados. Se identificaron una gran cantidad de genes relacionados con el Acetil CoA. Se encontraron también genes involucrados en ciclo celular, transporte y resistencia a drogas. Nuestros resultados muestran una alternativa al uso de modelos animales para el estudio de células gigantes y esto permitirá identificar nuevas dianas antifúngicas y marcadores de este tipo de células.

Por otra parte, se estudió cómo influye el huésped en la formación de células gigantes. Para ello, se comparó la morfología de *C. neoformans* en dos cepas de ratón con características genéticas diferentes: C57BL/6J y CD1. Observamos que la proporción de células gigantes era mayor en los ratones C57BL/6J. Esta mayor proporción de células gigantes se asoció a una mayor diseminación al cerebro, aumento de citoquinas antiinflamatorias (principalmente IL-4) y mayor producción de anticuerpos, confirmando que estos animales presentan una respuesta inmune de tipo Th2. Estos resultados mostraron que la formación de células gigantes no depende solo del patógeno sino también de factores del huésped.

Para profundizar en los factores del huésped que regulan la morfogénesis de *C. neoformans*, investigamos el papel de la citoquina 17 (IL-17) en la formación de células gigantes usando ratones deficientes en IL-17A (knockout *Il17a^{-/-}*)(KO). Observamos que las levaduras tenían un menor diámetro en los ratones *Il17a^{-/-}* en comparación con ratones C57BL/6J. El número de UFCs en el pulmón fue similar en ambas cepas de ratón. Sin embargo, hubo una mayor diseminación al cerebro en los ratones *Il17a^{-/-}*. Cuantificamos el perfil de citoquinas acumuladas en el cerebro tras 9 días de infección y todas se vieron incrementadas de forma significativa en los ratones *Il17a^{-/-}* en comparación con los ratones silvestres. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la IL-17 juega un papel importante en la contención de las levaduras en el pulmón e impedir la diseminación al cerebro.

Summary

Identification of the molecular mechanisms involved in the morphogenesis of *Cryptococcus neoformans* and study of their role during the infection

Introduction

Pathogenic fungi represent a risk to public health because they are a common cause of superficial and invasive diseases. Topical infections, such as colonization of the skin and mucosae affect millions of people. However, in the last decades there has also been an increase in the incidence of invasive fungal infections associated with an increase in the proportion of immunocompromised patients, such as transplant recipients, cancer patients with chemotherapy or radiotherapy.

Fungal infections are caused by yeasts and filamentous fungi. The yeasts species that have higher prevalence in humans belong to the genera *Candida* and *Cryptococcus*. Infections by filamentous fungi are mainly caused by *Aspergillus* spp. In addition, there are primary dimorphic fungi (mainly *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* and *Paracoccidioides brasiliensis*) that may affect immunocompetent individuals.

One of the main features of the majority of pathogenic fungi is their ability to change their morphology. These morphological changes occur during infection and play a key role in the development of the disease. Morphological changes in fungi may happen in two different ways: by changing the shape of the cells (such as the formation of hyphae and pseudohyphae), or by changing the size of the cells (i.e., inducing a massive growth of the blastoconidia). The best example of this last change is induced by *Cryptococcus neoformans*, which is a pathogenic yeast whose main phenotypic feature is the presence of a polysaccharide capsule around the cell body.

During infection, this fungus can increase its size in two different ways: by enlarging the size of the capsule without changing the size of the cell body or by increasing both structures resulting in the appearance of blastoconidia of an abnormal enlarged size denominated as “titan cells” (diameter larger than 30 microns). Both changes are very characteristic and contribute to evade the attacks of the immune system. The main objective of this work is to investigate the mechanisms that regulate morphogenesis in *C. neoformans*, and to delve deeper into the host factors that induce these changes.

Summary

Objetives

- To characterize the dynamics of the capsular synthesis and growth in *C. neoformans* and to study the virulence of mutants that do not increase the capsule size.
- To investigate conditions that induce the formation of titan cells *in vitro*.
- To identify genes that change their expression during titan cells formation using RNA sequencing (RNAseq).
- To characterize host factors that influence the formation of titan cells *in vivo*.

Results

In the first part of this work, we evaluated how capsular synthesis occurred using a strain expressing the *CAP59* gene (required for synthesis of the capsule), fused to the *GAL7* promoter, in a way that this strain only synthesizes the capsule when transferred to media that contains galactose as carbon source. Capsular polysaccharide first appeared in the capsule as small dots randomly distributed throughout the cell wall, indicating that it occurs in a non-polarized way. In addition, we studied if capsule enlargement was dependent on mitochondrial activity using inhibitors of mitochondrial oxidative phosphorylation. We observed that this phenomenon did not occur in the presence of inhibitors such as antimycin A (which inhibits complex III), salicyldydroxamic acid (SHAM, which blocks the alternative oxidases pathway) or rotenone (which inhibits complex I). These results reveal new aspects of the dynamic appearance and growth of the capsule.

Titan cells formation is another characteristic morphological change of *C. neoformans* during infection. However, little is known about of the factors that induce this transition. In this work, we have shown that *C. neoformans* induced titan cells in laboratory conditions when the cells grow in limiting-nutrient media at neutral pH supplemented with fetal bovine serum. In addition, other factors such as sodium azide, oxygen limitation and a CO₂-enriched atmosphere favored this morphological change. The formation of titan cells is regulated by the phenomena of "quorum sensing", as it was only observed at low cell densities, and it required the presence of the capsule, since titan cells are not formed by acapsular mutants.

Additionally, we wanted to investigate the gene expression profile in the titan cells by RNA sequencing (RNAseq) both in *in vitro* and *in vivo* conditions.

When we performed a comparative analysis of the results of both RNAseq, we obtained a total of 80 overexpressed genes. A high number of Acetyl CoA related genes was identified. In addition, genes involved in cell cycle, transport and drug resistance were

detected. Our results show an alternative to the use of animal models for the study of titan cells and they may allow the identification of new antifungal targets and titan cell markers.

We also studied how the host factors influence the titan cells formation. For this purpose, we compared the cryptococcal morphology in two mouse strains genetically different: C57BL/6J and CD1. We observed that titan cells proportion was higher in C56BL/6J mice. This higher proportion was associated with further dissemination to the brain, increased anti-inflammatory cytokines (mainly IL-4) and increased production of antibodies, confirming that these animals have a Th2 type immune response. These results proved that titan cell formation depends both on microbial and host factors, and suggest that non-protective Th2 type response favor cryptococcal cellular growth.

To gain insights about specific host factors that regulate titan cell formation, we investigated the role of IL-17 using knockout mice *Il17a*^{-/-}. We found that cryptococcal cells had a smaller diameter in *Il17a*^{-/-} to C57BL/6J mice. The number of CFUs in the lung was similar in both mouse strains. However, we observed more dissemination to the brain in *Il17a*^{-/-} mice. We quantified the cytokine accumulation profile in the brain after 9 days of infection, and all of them were significantly increased in *Il17a*^{-/-} mice compared to wild type mice. Our results support the hypothesis that IL-17 plays an important role in containing the yeasts in the lung and prevents the spread to the brain.

Conclusions

- The synthesis of the capsule of *Cryptococcus neoformans* occurs randomly throughout the cells
- Capsular enlargement in *Cryptococcus neoformans* depends on the proper functioning of the mitochondria.
- Titan cells of *C. neoformans* are formed *in vitro* in the presence of mammalian serum in limiting nutrient media.
- Titan cells formation in *C. neoformans* requires the presence of capsule and it is regulated by "quorum sensing".
- Titan cells overexpressed genes encoding transporters, metabolic proteins and enzymes related to acetyl-CoA, indicating that these cells induce metabolic changes that allow adaptation to host conditions.

Summary

- The formation of Titan cells *in vivo* correlates with induction of Th2-type responses.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los hongos patógenos

Los hongos patógenos suponen un riesgo para la salud pública, ya que son una causa frecuente de enfermedad superficial y diseminada. Las infecciones tópicas, como la colonización de la piel y de las mucosas afectan a millones de personas. Sin embargo, en las últimas décadas ha habido también un incremento en la incidencia de las infecciones fúngicas invasoras asociado a un aumento en la proporción de pacientes inmunocomprometidos, como pacientes trasplantados, enfermos de cáncer en tratamiento de quimioterapia o radioterapia y pacientes que han sufrido cirugía grave (Bitar *et al.*, 2014; Horn *et al.*, 2009; Neofytos *et al.*, 2009; Pfaller and Diekema, 2007; Puig-Asensio *et al.*, 2014). Las infecciones fúngicas invasoras oportunistas incrementan significativamente la morbilidad, mortalidad y los costes de gestión de los pacientes, estimándose que estas infecciones suponen un gasto adicional al sistema nacional de salud de unos 30.000-50.000 euros por paciente (Ceasay *et al.*, 2015).

Las infecciones fúngicas están causadas por levaduras y hongos filamentosos. Las levaduras que tienen mayor incidencia clínica pertenecen a los géneros *Candida* y *Cryptococcus* (Miceli *et al.*, 2011; Rueping *et al.*, 2009; Warnock, 2007). Las infecciones por hongos filamentosos están causadas principalmente por especies del género *Aspergillus* (Latge and Steinbach, 2009). Además, existen los hongos dimórficos primarios (principalmente *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*) que pueden causar enfermedad en individuos inmunocompetentes (Woods, 2002).

1.2 Papel de la respuesta inmune en el desarrollo de infecciones fúngicas invasoras

El desarrollo de una infección fúngica invasora es un proceso multifactorial donde están involucrados elementos tanto del huésped como del patógeno (Casadevall and Pirofski, 2003; Casadevall and Pirofski, 2015). Una alteración en la respuesta inmune es el principal factor que determina la aparición de este tipo de infección.

El resultado de la interacción huésped-patógeno puede ir desde la eliminación del patógeno hasta infección y muerte del huésped, pasando por estados de latencia, colonización y comensalismo que en ocasiones evoluciona a enfermedad (Casadevall *et al.*, 2000; Pirofski and Casadevall, 2002). Por ejemplo, *Candida albicans* es una levadura comensal que coloniza membranas mucosas y la piel (Brown *et al.*, 2014). No obstante, puede causar infección invasiva severa cuando hay una alteración del estado inmune

(neutropenia, pancreatitis, insuficiencia renal o tratamientos con corticoides (Pfaller and Diekema, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Gudlaugsson *et al.*, 2003). Por otra parte, una respuesta inmune exagerada puede también tener efectos deletéreos para el huésped. Un ejemplo es el síndrome inflamatorio de reconstitución inmunológica (IRIS, por sus siglas en inglés), el cual se observa en algunos pacientes con SIDA (virus de la inmunodeficiencia humana) tras el inicio de la terapia antirretroviral. Si en esta situación de recuperación de la inmunidad el paciente está infectado con algunos patógenos (como *Cryptococcus neoformans* o *Mycobacterium tuberculosis*), puede inducir una respuesta inflamatoria exagerada, lo cual lleva a empeorar el estado de salud del paciente.

Por lo tanto, el estado inmune del huésped es uno de los principales factores que define la capacidad de los hongos patógenos oportunistas de causar enfermedad.

En general, una respuesta de tipo Th1 y Th17 proporciona protección contra infecciones fúngicas, mientras que una respuesta de tipo Th2 está asociada con una falta de protección o agravamiento de la enfermedad (Zaragoza *et al.*, 2007; Lass-Flörl *et al.*, 2013; Conti *et al.*, 2009; Kagami *et al.*, 2010).

1.3 Factores del hongo que contribuyen a la enfermedad

En lo que respecta a los factores del patógeno, existen dos causas principales por las que los hongos causan enfermedad. En primer lugar, estos microorganismos son capaces de expresar factores de virulencia, que se definen como elementos del patógeno que causan daño en el huésped. Además, los hongos tienen capacidad de adaptarse al ambiente del huésped, sobrevivir y proliferar en casos de inmunidad debilitada. Las condiciones en las que se encuentran los hongos patógenos durante la infección son muy variables y por lo tanto, su virulencia depende de la adaptación a diferentes ambientes.

1.3.1 Factores que causan daño en el huésped

Los principales factores que causan daño al huésped son enzimas líticas, como proteasas, lipasas y fosfolipasas. Hay muchos estudios que se han centrado en las funciones de las proteasas en la virulencia e indican que su actividad altera la permeabilidad de la barrera epitelial e induce una respuesta inflamatoria (Yike, 2011). Por otra parte, estas proteínas juegan un papel en la nutrición, ya que catalizan la hidrólisis de péptidos en el caso de las proteasas, o de los enlaces éster de los triacilglicéridos en el caso de las lipasas. Además, estas enzimas pueden degradar tejidos y contribuir a la diseminación, adquisición de hierro y a la evasión del sistema inmune. Las fosfolipasas degradan fosfolípidos de membrana, por lo que alteran la estructura e inducen la lisis celular (Ghannoum, 2000; Schmiel and Miller, 1999). Por esta razón, las fosfolipasas contribuyen a la invasión de

tejidos y diseminación. Además, recientemente se ha descrito en *C. albicans* una proteína tóxica citolítica (Ece1p o candidalisina) que causa daño directo en las membranas epiteliales y activa una respuesta inflamatoria epitelial. Ecep1 es crucial para la invasión de las mucosas (Moyes *et al.*, 2016).

1.3.2 Adaptación a condiciones del huésped

La adaptación a diferentes ambientes es esencial para la supervivencia de los hongos durante la infección. Los hongos tienen sistemas para detectar y adaptarse a cambios de temperatura, fuentes de carbono, disponibilidad de iones y pH.

En el caso de los hongos patógenos que se adquieren del ambiente, la temperatura, pH, nutrientes y concentraciones de gases como CO₂ y O₂ cambian en el huésped. La temperatura ambiental normalmente es más baja que la temperatura corporal, por lo que la supervivencia y replicación a esta temperatura es imprescindible para la virulencia (Perfect, 2005). Curiosamente, la gran mayoría de hongos no crecen a temperaturas superiores a 30 °C, y hay una correlación entre el crecimiento a 37 °C y la capacidad de causar enfermedad en mamíferos (Robert *et al.*, 2015; Bergman and Casadevall, 2010; Robert and Casadevall, 2009). Los hongos patógenos también deben adaptarse a diferentes pHs, ya que las superficies mucosas son ácidas y la sangre y los tejidos son ligeramente alcalinos (Peñalva *et al.*, 2008). Las concentraciones de CO₂ y oxígeno se invierten en los tejidos, dejando a los hongos en un ambiente de hipoxia y altas concentraciones de CO₂. Por otra parte, la supervivencia del hongo requiere la asimilación de las fuentes de carbono disponibles en el organismo, lo que requiere adaptación metabólica (Cooney and Klein, 2008).

Sin embargo, hay otros casos, como el de *C. albicans*, que no se aíslan del ambiente, y son comensales humanos (Iliev *et al.*, 2012; Wachtler *et al.*, 2011). Incluso en esta situación, en la que la levadura está altamente adaptada al huésped, es necesario inducir respuestas que le permitan adaptarse al ambiente específico de cada órgano y tejido (Polke *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2013).

Por lo tanto, para que los hongos puedan sobrevivir y producir infección, deben adaptarse a un ambiente con múltiples factores y en constante cambio.

1.3.3 Morfogénesis fúngica

Una de las principales características de la mayoría de los hongos es la capacidad de cambiar de morfología. En general, las transiciones morfológicas pueden dividirse en dos clases. Algunos hongos pueden cambiar la forma de las células, siendo el más característico

la formación de filamentos en las especies de *Candida* y *Aspergillus*. Sin embargo, otros hongos pueden experimentar otro tipo de transición que resulta en un cambio en el tamaño de la célula sin cambiar la forma (crecimiento masivo de la blastoconidia), como ocurre en las especies de *Cryptococcus*. Estos cambios ocurren durante la infección y son importantes en procesos como adhesión, invasión, diseminación y evasión de la respuesta inmune.

1.3.3.1 Hongos que cambian de forma durante la infección. El caso de *Candida albicans*

Las especies de *Candida* son levaduras que forman parte de la flora habitual de mucosas y pueden causar un amplio espectro de infecciones humanas, conocidas como candidiasis. Este género incluye al menos 30 especies de importancia clínica (Silva *et al.*, 2012; Pf Fuller *et al.*, 2011). Durante las últimas décadas, la incidencia de infecciones causadas por el género *Candida* ha aumentado significativamente y además, cada año se detectan nuevas especies de este género capaces de causar enfermedad en humanos (Sobel, 2007; Pf Fuller *et al.*, 2011). *Candida albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en casos de candidiasis (45-50%) (Del Palacio *et al.*, 2009). Otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y en menor proporción *C. tropicalis* y *C. krusei* suponen aproximadamente el 50% de los casos de candidemia (Almirante *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2009; Guinea, 2014).

La formación de pseudohifas e hifas es una característica de muchas de las especies del género *Candida*. Las hifas se forman cuando aparece un tubo a partir de una blastoconidia (que se denomina tubo germinal), el cual resulta en un largo filamento tras continuo crecimiento. Las hifas pueden contener septos que separan las células con núcleos individuales o ser continuas con múltiples núcleos. Por otra parte, las pseudohifas se forman cuando las gemas de una blastoconidia no se separan totalmente y se forma una cadena de células unidas (Gow, 1997; Sudbery *et al.*, 2004).

1.3.3.1.1 Importancia de las hifas en la virulencia

Candida albicans posee múltiples factores que contribuyen a su patogenicidad que incluyen, adherencia a células epiteliales y endoteliales o producción de proteasas y fosfolipasas (Cassone *et al.*, 1987; Barrett-Bee *et al.*, 1985; Ibrahim *et al.*, 1995). Pero además, la capacidad de formar hifas y pseudohifas también contribuye a la virulencia de esta levadura (Odds, 1984; Sobel *et al.*, 1984; Fidel *et al.*, 1999), por lo que la formación de hifas ha sido muy estudiada en esta especie. Esta levadura cambia a crecimiento filamentoso en respuesta a estímulos como una temperatura de 37 °C, suero de mamíferos,

N-acetilglucosamina, y pH neutro (Sudbery, 2011; Taschdjian *et al.*, 1960; Simonetti *et al.*, 1974; Buffo *et al.*, 1984).

La formación de hifas juega un papel muy importante en el desarrollo de la infección diseminada. La superficie de las hifas contiene diferentes adhesinas (como Als3 y Hwp1) que incrementan la unión de las células fúngicas a las superficies (Phan *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2007; Staab *et al.*, 1999; Sundstrom *et al.*, 2002). Las hifas también participan en la invasión y penetración activa de los órganos debido a la presión física que ejercen sobre los tejidos (Naglik *et al.*, 2011).

La filamentación y la expresión de adhesinas también es clave para la formación de biofilms, que son comunidades de microorganismos que crecen unidos a una superficie, y son una fuente de infección en pacientes con implantes y catéteres (Nobile and Johnson, 2015; Finkel and Mitchell, 2011). Por otra parte, la formación de hifas contribuye a evadir la fagocitosis, ya que tras la internalización de las blastoconidias por los macrófagos, *C. albicans* puede filamentar, lo cual le permite perforar la membrana de los fagocitos y evadir la muerte celular (McKenzie *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2009; Cutler and Poor, 1981).

1.3.3.2 Hongos que no cambian de forma durante la infección

La formación de hifas no es un fenómeno universal, ya que hay hongos con una prevalencia clínica significativa que no inducen esta transición. Los tres ejemplos más claros son *Candida glabrata*, los hongos dimórficos y levaduras del género *Cryptococcus*.

1.3.3.2.1 *Candida glabrata* y hongos dimórficos

Candida glabrata es una levadura comensal y una de las causas más comunes de candidemia (Pfaller and Diekema, 2007; Puig-Asensio *et al.*, 2014; Borst *et al.*, 2005; Warnock *et al.*, 1988; Sanglard *et al.*, 2001). Morfológicamente, *C. glabrata* se encuentra normalmente como pequeñas blastoconidias de 1-4 micras de diámetro (Fidel *et al.*, 1999). Recientemente, se ha descrito que mutaciones en el gen *CHS2* (que codifica una de las quitina sintetas) da lugar a cepas de *C. glabrata* con fenotipo de crecimiento de pseudohifas y con incremento en la virulencia (Brunke *et al.*, 2014). Sin embargo, esta levadura se encuentra mayoritariamente en forma de blastoconidia durante la infección, lo que indica que su virulencia está asociada a otros factores. De hecho, a nivel evolutivo, *C. glabrata* es más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans*, *C. tropicalis* o *C. parapsilosis* (Turner and Butler, 2014).

Los hongos dimórficos representan una familia de ascomicetos relacionados filogenéticamente (*Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* y *Sporothrix*)

que crecen en forma de micelio a temperatura ambiente, pero en el huésped se encuentran como levadura (Galgiani, 1999; Ajello, 1971; Klein and Tebbets, 2007). A pesar de no filamentosar en el huésped, los hongos dimórficos son clínicamente relevantes ya que son patógenos primarios que pueden infectar a huéspedes inmunocompetentes. Además, la conversión de micelio a levadura es requerida para la virulencia (Rooney and Klein, 2004).

1.3.3.3 Hongos que cambian de tamaño durante la infección: *Cryptococcus*

Algunos hongos tienen la capacidad de inducir un tipo de cambio morfológico que no supone un cambio en la forma de la célula, pero sí incremento significativo en su tamaño. Este es el caso de *Emmonsia*, que es un hongo saprófito del suelo, que se caracteriza por formar durante la infección células de gran tamaño (llamadas adiasporas) que pueden llegar a medir 500-700 micras (Emmons and Jellison, 1960).

Pero el ejemplo más estudiado de hongo que cambia de tamaño en el huésped es *C. neoformans*. Esta levadura se encuentra principalmente en forma de blastoconidia esférica en los pulmones. Sin embargo, es capaz de aumentar significativamente de tamaño, originando una población de células muy heterogénea que contribuyen a evadir el sistema inmune. *Cryptococcus neoformans* es la levadura modelo que se ha utilizado en esta tesis doctoral, por lo que en las siguientes secciones se detallarán sus principales características como patógeno y la importancia de la morfogénesis en su virulencia.

1.4 *Cryptococcus* y criptococosis: introducción a su biología

La criptococosis es una enfermedad fúngica sistémica causada por algunas especies del género *Cryptococcus*, principalmente *C. neoformans* y *C. gattii*. Ambas se encuentran en el ambiente, donde pueden causar enfermedad en una amplia variedad de organismos; desde depredadores unicelulares (amebas y protozoos) hasta plantas, nematodos, insectos y mamíferos acuáticos y terrestres (Feldmesser *et al.*, 2000; Mylonakis *et al.*, 2002; Staib *et al.*, 1972; Venn-Watson *et al.*, 2012; Warpeha *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2007).

Aunque *C. neoformans* y *C. gattii* están estrechamente relacionados, difieren en su distribución y epidemiología. *Cryptococcus neoformans* es un patógeno oportunista, mientras que *C. gattii* puede causar enfermedad en individuos inmunocompetentes (Sorrell, 2001). En ambos casos, la principal característica fenotípica es la presencia de una cápsula de polisacárido que rodea el cuerpo celular (Benham, 1935) y que confiere propiedades físicas, bioquímicas e inmunológicas particulares a estos microorganismos. Por esta razón, la cápsula ha sido objeto de un gran número de estudios que han establecido su papel como factor de virulencia (Chang and Kwon-Chung, 1994; Zaragoza *et al.*, 2009; O'Meara and Alspaugh, 2012).

1.4.1 Clasificación y nomenclatura

Desde que fue descrito por primera vez, *C. neoformans* ha sido denominado por diferentes nombres, como *Saccharomyces neoformans* o *Torula histolytica* (ver revisión en (Kwon-Chung, 2011)). En 1901, Vuillemin consideró que este patógeno pertenecía al género *Cryptococcus* y ya en 1949, *C. neoformans* se dividió en 3 serotipos (A, B y C) (Evans, 1949). Años más tarde, se describieron los serotipos D y A/D (híbrido) (Wilson *et al.*, 1968). *Cryptococcus gattii* fue descrito en 1970 y se corresponde con los serotipos B y C, los cuales fueron más tarde agrupados como *C. neoformans* variedad *gattii*. Sin embargo, debido a las diferencias morfológicas y genéticas entre las dos variedades, *C. gattii*, fue finalmente reconocido como una especie diferente en 2006 (Kwon-Chung and Varma, 2006). En *C. neoformans*, el serotipo A se denomina *C. neoformans* var. *grubii* (Franzot *et al.*, 1999), y el serotipo D se denomina *C. neoformans* var. *neoformans*. Además, se han descrito los híbridos A/B y B/D (Aminnejad *et al.*, 2012; Bovers *et al.*, 2006).

Tabla 1.1. Clasificación del complejo *Cryptococcus*.

Nombre clásico de la especie	Serotipo	Nombre de especie propuesto
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	<i>Cryptococcus neoformans</i>
AD híbrido	AD	<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	B/C	<i>Cryptococcus gattii</i> <i>Cryptococcus bacillisporus</i> <i>Cryptococcus deuterogattii</i> <i>Cryptococcus tetragattii</i> <i>Cryptococcus decagattii</i>

El desarrollo de distintas técnicas de biología molecular ha permitido una clasificación más detallada de las especies del complejo *neoformans/gattii* (ver tabla 1.1). Recientemente, se ha propuesto que cada genotipo sea considerado como una especie diferente (tabla 1.1) (Hagen *et al.*, 2015). Sin embargo, esta nomenclatura no está todavía totalmente establecida en el campo, por lo que durante el desarrollo de esta tesis, se mantendrá la nomenclatura que define especies y variedades.

1.4.2 *Cryptococcus neoformans*; incidencia, epidemiología y enfermedad.

Cryptococcus neoformans es conocido como levadura patógena desde el siglo XIX, aunque su incidencia aumentó en el siglo XX debido a la aparición del VIH. En algunas regiones, como Estados Unidos, el 10% de los pacientes VIH positivos sufrieron criptococosis (Casadevall and Perfect, 1998). Con el desarrollo de la terapia antirretroviral de alta actividad (HAART), se ha controlado la incidencia de la criptococosis en países desarrollados, aunque la mortalidad asociada sigue siendo alta (Chottanapund *et al.*, 2007; Dromer *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2007; Lortholary *et al.*, 2006; Mirza *et al.*, 2003). Por otra parte, se han descrito nuevos grupos de riesgo, como pacientes trasplantados (Singh *et al.*, 2008) y enfermos de cáncer. En la actualidad, la mayor prevalencia de la criptococosis tiene lugar en países en vías de desarrollo como África subsahariana, Asia y América del Sur, de tal manera que en el año 2009 se estimó que el número de muertes anuales por esta enfermedad es alrededor de 650.000 (Park *et al.*, 2009).

Cryptococcus neoformans tiene una distribución cosmopolita (Lazera *et al.*, 2000), y se aísla de múltiples nichos, principalmente del guano de paloma y en barrizales (Casadevall and Perfect, 1998). Se cree que *C. neoformans* se adquiere por inhalación de esporas alojándose en primer lugar en el pulmón (Casadevall and Perfect, 1998; Velagapudi *et al.*, 2009; Heitman *et al.*, 2011). La infección normalmente es controlada por el sistema inmune, eliminándose gradualmente, aunque en los últimos años hay evidencias de que *C. neoformans* puede causar infección asintomática y permanecer en estado latente durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión, puede diseminarse al sistema nervioso central (SNC) donde causa meningoencefalitis. Este cuadro clínico tiene una alta mortalidad asociada si no es diagnosticada y tratada a tiempo (Casadevall and Perfect, 1998). La diseminación del hongo e invasión de la barrera hematoencefálica (BHE) puede ocurrir mediante varios mecanismos: transcelular, paracelular y en el interior de células fagocíticas. La invasión transcelular tiene lugar cuando las levaduras se adhieren a la superficie apical, se internalizan y se expulsan por la parte basolateral de la BHE (Chang *et al.*, 2004). En la invasión paracelular las levaduras penetran entre células que forman la BHE, con o sin alteración de las uniones estrechas de la lámina basal (Kim, 2006). Por último, también se ha postulado que *C. neoformans* puede atravesar la BHE en el interior de células fagocíticas (lo que se ha llamado el mecanismo del “caballo de Troya”), ya que como se explica en la siguiente sección, esta levadura es un patógeno intracelular facultativo (Kim, 2008; Charlier *et al.*, 2009; Mansour and Levitz, 2002).

1.4.3 *Cryptococcus* como patógeno intracelular facultativo

Tras su inhalación, *C. neoformans* se aloja en los espacios alveolares del pulmón, donde puede sobrevivir y replicarse en el ambiente extracelular. Los espacios alveolares están recubiertos de células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas principalmente) que tratan de contener la infección. Por ello, la interacción de este hongo con estas células es de gran importancia para entender el desarrollo de la enfermedad. La cápsula de *C. neoformans* tiene propiedades antifagocíticas, ya que impide el reconocimiento de los epítomos de la pared por los receptores de las células fagocíticas (Casadevall and Perfect, 1998; Heitman *et al.*, 2011). Sin embargo, tras pocas horas de infección, *C. neoformans* se encuentra principalmente en el interior de los macrófagos. Esto es debido a que *in vivo*, la fagocitosis de *C. neoformans* ocurre gracias a opsonización por anticuerpos o proteínas del sistema del complemento. Una vez internalizado, *C. neoformans* tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, por lo que es considerado un patógeno intracelular facultativo. Se han descrito varios mecanismos que permiten la evasión de la muerte por macrófagos. *Cryptococcus neoformans* es capaz de modular el ambiente del fagolisosoma, ya que esta estructura no se acidifica totalmente (Smith *et al.*, 2015). Además, el fagolisosoma se vuelve permeable (Tucker and Casadevall, 2002), lo cual se cree que interfiere con su funcionalidad.

La supervivencia dentro de células fagocíticas puede dar lugar a varios fenómenos (ver en referencias (Garcia-Rodas and Zaragoza, 2012; Del Poeta and Mcquiston, 2011)):

1) *Cryptococcus neoformans* puede permanecer latente dentro de macrófagos, de igual manera que hacen otros patógenos intracelulares, como *Histoplasma* o *Mycobacterium*.

2) Dentro del macrófago, las levaduras también encuentran un nicho óptimo que favorece su división y replicación, aumentando de esta manera la carga fúngica dentro del huésped.

3) La replicación masiva dentro del macrófago puede tener dos consecuencias. En primer lugar, puede originar la explosión de la célula fagocítica y liberación de las levaduras al medio. Sin embargo, las células de *C. neoformans* también pueden salir al espacio extracelular mediante un proceso denominado “exocitosis no lítica” en el que la viabilidad del macrófago no se ve afectada.

4) Por último, también se ha descrito que las células de *C. neoformans* se pueden transferir entre macrófagos (transferencia lateral), aunque todavía no se sabe si este es un proceso inducido por el propio macrófago o por *C. neoformans*.

En resumen, la interacción entre este patógeno y las células fagocíticas es muy compleja, pero el resultado tiene un gran impacto en aspectos claves de la virulencia de esta levadura, como son la supervivencia en el huésped, la diseminación y la latencia (Alvarez and Casadevall, 2007; Alvarez and Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006; Coenjaerts *et al.*, 2006; Diamond and Bennett, 1973; Lee *et al.*, 1995; Mitchell and Friedman, 1972; Tucker and Casadevall, 2002).

1.5 Cápsula

La cápsula es la principal característica fenotípica de *C. neoformans* (ver figura 1.1). Además es el principal factor de virulencia de este patógeno porque tiene un gran número de efectos sobre el huésped y la respuesta inmune (McFadden and Casadevall, 2001; Vecchiarelli, 2000; Zaragoza *et al.*, 2009). Entre otros, la cápsula inhibe la fagocitosis del patógeno, bloquea la migración y diferenciación de linfocitos y la producción de anticuerpos (Ellerbroek *et al.*, 2002; Lipovsky *et al.*, 2000; Mitchell and Friedman, 1972; Murphy and Cozad, 1972). Por ello, la estructura y las propiedades inmunogénicas de la cápsula han sido objeto de múltiples estudios.

1.5.1 Composición de la cápsula

La cápsula de *C. neoformans* está compuesta de polisacárido altamente hidrofílico con un contenido de agua del 99% de su peso total (Maxson *et al.*, 2007a). La cápsula contiene 2 tipos principales de polisacáridos; glucuronoxilomanano (GXM) que constituye el 90-95%, y galactoxilomanano (GalXM) que es el 5-8%. Además, también contiene una pequeña proporción de manoproteínas (<1%) (Raschke *et al.*, 1978; Zaragoza *et al.*, 2009).

El GXM es un polímero largo de manosas unidas por enlaces α -(1,3) con ramificaciones de ácido glucurónico unidas por enlaces β -(1,2) y xilosas unidas por enlaces β -(1,2) o β -(1,4) dependiendo del serotipo (Cherniak and Sundstrom, 1994; Cherniak *et al.*, 1988; McFadden *et al.*, 2006; McFadden *et al.*, 2007). El GalXM se ha descrito como un polímero de galactosas unidas por enlaces α -(1,6) con ramificaciones de manosas y xilosas (Vaishnav *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha descrito que el GalXM también contiene trazas de ácido glucurónico, por lo que se ha renombrado a glucuronogalactoxilomanano (GXMGal) (Heiss *et al.*, 2013).

Mientras que el GXM parece estar distribuido por toda la cápsula, la localización exacta del GalXM no se conoce en detalle. Algunos estudios indican que se encuentra asociado a la pared celular (Vaishnav *et al.*, 1998; van de Moer *et al.*, 1990), pero también ha sido descrito como un compuesto asociado a vesículas (van de Moer *et al.*, 1990). Estos

polisacáridos, además de estar unidos a la pared celular formando la estructura física de la cápsula, también pueden ser liberados por la célula al medio (exopolisacárido).

La estructura y densidad de la cápsula varían según la cepa y las condiciones ambientales (Gates *et al.*, 2004; Frases *et al.*, 2009). La capacidad de cambiar de estructura afecta a la interacción con el huésped (Cordero *et al.*, 2011) e influye en el reconocimiento por el sistema inmune (Garcia-Hermoso *et al.*, 2004; Cleare and Casadevall, 1998; Kozel *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 1998; Todaro-Luck *et al.*, 1989). Por otra parte, los cambios estructurales de la cápsula se han relacionado con la capacidad de diseminación y colonización de distintos órganos (Charlier *et al.*, 2005; Garcia-Hermoso *et al.*, 2004).

1.5.2 Síntesis de la cápsula

Se han identificado diferentes genes involucrados en la síntesis de la cápsula, siendo el primero *CAP59* (Chang and Kwon-Chung, 1994). La delección de este gen produce un fenotipo acapsular y pérdida de virulencia. Después, se identificaron otros 3 genes; *CAP64* (Chang *et al.*, 1996), *CAP60* (Chang and Kwon-Chung, 1998) y *CAP10* (Chang and Kwon-Chung, 1999). Todos son necesarios para la virulencia de *C. neoformans* en ratones. Además, los genes *CAS*, que están involucrados en la inserción de xilosas y/o la acetilación del polisacárido de la cápsula (Janbon *et al.*, 2001; Moyrand *et al.*, 2004) también son necesarios para la síntesis de la cápsula. Otros mutantes deficientes en xilosilación, como *cxt1*, son menos virulentos (Klutts and Doering, 2008). *Pbx1* y *Pbx2* son proteínas que regulan la incorporación de residuos de glucosa (Liu *et al.*, 2007). También, se ha descrito que los genes *UXS1* y *UGD1* participan en la regulación de la cápsula (Bar-Peled *et al.*, 2001; Janbon *et al.*, 2001; Kozel *et al.*, 2003; Moyrand *et al.*, 2004). Finalmente, la cápsula contiene ácido hialurónico (AH), el cual es importante para cruzar la BHE (Jong *et al.*, 2007). Células carentes de AH tienen una cápsula de menor diámetro y defectos en la estructura de la pared celular (Jong *et al.*, 2007).

Por otra parte, la ruta *Pka1-AMPc* es imprescindible para la síntesis de la cápsula (Alspaugh *et al.*, 2002). Esta vía interviene en la detección de niveles de glucosa y nitrógeno a través de los receptores acoplados a proteínas G, y regula el pH intracelular a través del factor de transcripción *Rim101* (O'Meara and Alspaugh, 2012). La ruta del *AMPc* también participa en la detección de niveles de hierro regulando la actividad del factor de transcripción *Cir1*. *Ova1*, una manoproteína regulada negativamente por *Pka1*, ha sido implicada en el tráfico del polisacárido de la cápsula (Hu *et al.*, 2007). Con respecto a otras rutas de señalización, también se ha involucrado a algunas *MAPKs* (como *Hog1*) como reguladores de la síntesis de la cápsula (O'Meara and Alspaugh, 2012), aunque su papel todavía no se conoce en detalle.

Tampoco se conoce cómo es transportado el polisacárido al exterior de la célula y cómo se ensambla para formar la cápsula. En los últimos años, hay estudios que sugieren que el polisacárido es secretado en el interior de vesículas que atraviesan la pared celular (Rodrigues *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008b; Casadevall *et al.*, 2009). Mutaciones en las rutas de secreción (*sec4/sav1* y *sec6*) resultan en un fenotipo hipocapsular. Además, estas vesículas participan en la interacción de *C. neoformans* con células fagocíticas (Oliveira *et al.*, 2010). No obstante, el mecanismo por el que el polisacárido capsular es liberado de las vesículas y unido a la superficie de la célula se desconoce.

1.5.3 Otros factores de virulencia: Melanina y ureasa

La producción de enzimas como lacasa y ureasa son características de *C. neoformans*. La lacasa es la enzima responsable de la síntesis de melanina a partir de compuestos difenólicos (como la L-DOPA), se localiza en la pared celular y contribuye a la supervivencia de *C. neoformans* ayudando a mantener la integridad de la pared (Zhu *et al.*, 2001). La melanina es un pigmento de alto peso molecular, cargado negativamente, hidrofóbico e insoluble en soluciones acuosas que protege a las células de *C. neoformans* frente a factores de estrés, lo que facilita la supervivencia del hongo en el huésped (Casadevall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Noverr *et al.*, 2004; Rosas and Casadevall, 1997; Wang and Casadevall, 1994). La producción de melanina contribuye a la virulencia (Salas *et al.*, 1996) y a la diseminación desde los pulmones a otros órganos (Noverr *et al.*, 2004). Por ello, mutantes que no acumulan melanina son menos virulentos.

Por otra parte, la ureasa participa en la virulencia de *C. neoformans* ya que promueve la retención del hongo en microcapilares, lo que parece ser un paso crítico en la diseminación al cerebro (Olszewski *et al.*, 2004; Pettinato *et al.*, 1991). La ureasa también induce una respuesta inmune de tipo Th2, la cual no es efectiva para controlar la infección (Osterholzer *et al.*, 2009).

1.6 Morfogénesis en *Cryptococcus neoformans*

Por lo general, *C. neoformans* solo forma filamentos durante la reproducción sexual (Kozubowski and Heitman, 2012; Klein and Tebbets, 2007), aunque ocasionalmente se han observado pseudohifas en tejidos (Neilson *et al.*, 1978; Williamson *et al.*, 1996; Gazzoni *et al.*, 2010). La formación de pseudohifas en *C. neoformans* está inducida por la limitación de nitrógeno (Gazzoni *et al.*, 2010) y es reprimida por proteínas de la ruta RAM (Magditch *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015). Además, mutantes que forman más pseudohifas son menos virulentos y diseminan menos al cerebro (Zhai *et al.*, 2013). Por este motivo, se cree que

estas formas pueden contribuir a la persistencia de *C. neoformans* en el huésped, pero no participan en la diseminación del hongo.

Sin embargo, *C. neoformans* se caracteriza por inducir otro tipo de cambios durante la infección, que no implican un cambio de forma, sino de tamaño. *Cryptococcus neoformans* puede aumentar su tamaño de dos maneras: aumentando el tamaño de la cápsula sin cambiar el tamaño del cuerpo celular o aumentando el tamaño de ambas estructuras formando lo que se ha denominado células gigantes. Estos cambios hacen que la población de levaduras en el pulmón sea muy heterogénea, encontrándose células de tamaño normal o de tamaño mucho más grande, lo cual contribuye a evadir la respuesta inmune.

1.6.1 Cambios de tamaño de la cápsula

El aumento de tamaño de la cápsula de *C. neoformans* es uno de sus rasgos más característicos y puede observarse *in vitro* en diferentes medios (Littman, 1958; Vartivarian *et al.*, 1993; Granger *et al.*, 1985; Zaragoza *et al.*, 2003a; Zaragoza and Casadevall, 2004). En medios ricos, el tamaño de la cápsula es de 1-2 micras, pero hay condiciones que inducen un aumento drástico de su tamaño. Este fenómeno fue descrito por primera vez en los años 50 (Littman, 1958). Posteriormente, se demostró que el CO₂ y la limitación de hierro inducen el crecimiento de la cápsula (Granger *et al.*, 1985; Vartivarian *et al.*, 1993). Más recientemente, se han descrito otros factores que inducen este proceso, como el suero de mamífero, medios con baja concentración de nutrientes a pH neutro o el manitol (Guimaraes *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2003a; Zaragoza and Casadevall, 2004). Por el contrario, factores como la presión osmótica o altas concentraciones de glucosa reducen el tamaño de la cápsula (Dykstra *et al.*, 1977; Farhi *et al.*, 1970; Jacobson *et al.*, 1989). Se conoce muy poco sobre la regulación y los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno (Zaragoza *et al.*, 2009; O'Meara and Alspaugh, 2012; Doering, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Hasta el momento, se han encontrado dos reguladores de la transcripción necesarios para inducir el aumento de tamaño de la cápsula: Gat201 y Ada2 (Liu *et al.*, 2008; Haynes *et al.*, 2011). Mutantes carentes de la proteína Gat201 tienen cápsula, pero no aumentan el tamaño de la misma al transferir las células a medios inductores, lo que sugiere que este regulador está involucrado en el crecimiento capsular. Además, se ha demostrado que mutantes *gat201* producen más melanina que la cepa silvestre. Se cree que este regulador inhibe la fagocitosis por macrófagos a través de un mecanismo independiente de la cápsula, ya que mutantes *gat201* son fagocitados más eficientemente que la cepa silvestre (Liu *et al.*, 2008).

El crecimiento de la cápsula ocurre principalmente en la fase G1 del ciclo celular (Garcia-Rodas *et al.*, 2014). Se sabe que el aumento de tamaño de la cápsula requiere la acumulación de una cantidad importante de nuevo polisacárido (Pierini and Doering, 2001; Zaragoza and Casadevall, 2006). Se ha estimado que el aumento de peso de las células debido al crecimiento de la cápsula es alrededor del 20 % del peso total de la célula, y este fenómeno ocurre en unas pocas horas (Maxson *et al.*, 2007b). Este hecho sugiere que es un proceso costoso energéticamente para la célula, lo cual es particularmente significativo, ya que el aumento de tamaño de la cápsula suele producirse en condiciones limitantes de nutrientes.

El crecimiento capsular es una de las primeras respuestas de *C. neoformans* tras alojarse en los pulmones. Por este motivo, se considera una respuesta morfológica temprana (Feldmesser *et al.*, 2001). Además, en pacientes con meningitis criptocócica, la presión intracraneal está directamente relacionada con el tamaño de la cápsula de las levaduras presentes en el líquido cefalorraquídeo (Robertson *et al.*, 2014). Las células con cápsula de mayor tamaño son más resistentes a factores de estrés, como radicales libres o péptidos antimicrobianos (Zaragoza *et al.*, 2008), lo que sugiere un mecanismo que permite la supervivencia de *C. neoformans* dentro de los macrófagos. Además, este fenómeno es importante para evadir la fagocitosis mediada por complemento por parte de los macrófagos (Zaragoza *et al.*, 2003b).

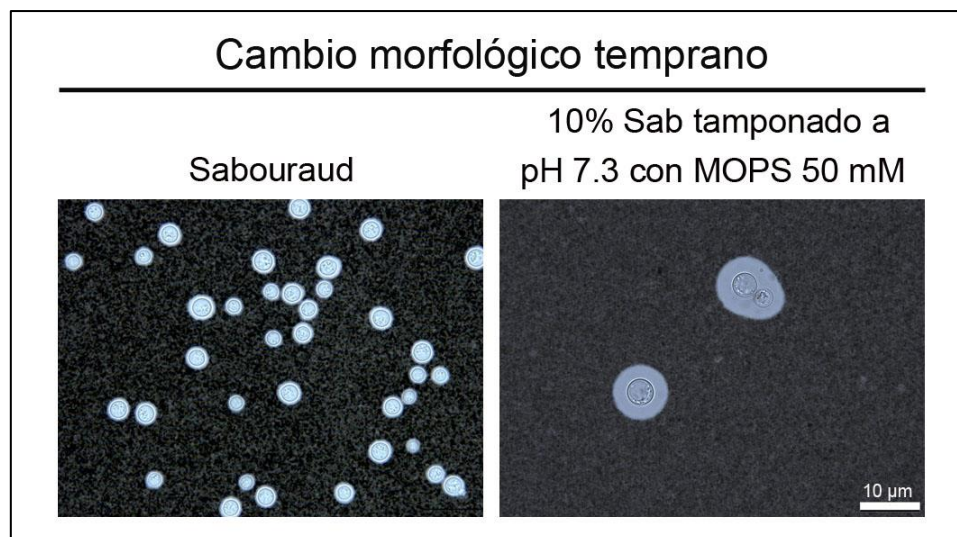


Figura 1.1. Visualización de la cápsula de *C. neoformans*. Células de *C. neoformans* suspendidas en tinta china, en las que la cápsula se observa como un halo blanco alrededor de la célula. El panel izquierdo muestra células con cápsula pequeña (incubadas en Sabouraud), y en el panel derecho células con cápsula grande (inoculadas en medio inductor, 10% de Sabouraud tamponado a pH 7,3).

1.6.2 Formación de células gigantes

Otro cambio morfológico característico de *C. neoformans* ocurre cuando hay un crecimiento masivo no solo de la cápsula, sino también del cuerpo celular. De esta manera, pueden formarse blastoconidias de un tamaño superior a 30 micras, que se denominan células “gigantes” o “titanes”, aunque pueden llegar a alcanzar hasta 70-100 micras (Feldmesser *et al.*, 2001; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Zaragoza and Nielsen, 2013). Este cambio se considera una respuesta morfológica tardía, ya que se observan al cabo de varios días de infección. Estas células se habían descrito ocasionalmente en muestras clínicas (Wang *et al.*, 2014; Love *et al.*, 1985), pero no fueron caracterizadas en detalle hasta el año 2010 (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Las células gigantes son poliploides, tienen una pared celular engrosada y poseen una cápsula más densa que las células de tamaño normal (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Por otra parte, estas células pueden proliferar y dar lugar a una progenie de tamaño normal (García-Rodas *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 2010). Las células gigantes y su progenie son más resistentes a factores de estrés (Gerstein *et al.*, 2015), lo que proporciona un mecanismo de adaptación al huésped y evasión de la respuesta inmune.

1.6.2.1 Factores que favorecen la formación de células gigantes

Aunque la formación de células gigantes no se ha caracterizado en detalle, se han descrito algunos factores que favorecen su formación. En general, se sabe que es un mecanismo complejo, en el cual no solo participan determinadas rutas de transducción del microorganismo, sino que el ambiente del huésped es también determinante para su formación.

1.6.2.1.1 Rutas implicadas en la formación de células gigantes

La principal ruta que se ha relacionado con la formación de células gigantes es la señalización a través del AMPc, ya que mutantes de la adenilato ciclasa no forman estas células (Zaragoza *et al.*, 2010). Se han descrito dos receptores acoplados a proteínas G que son importantes para la inducción de las células gigantes: Ste3a (receptor de feromona α) y la proteína Gpr5. Ambos receptores controlan la formación de células gigantes a través de elementos de la ruta del AMPc. La señalización por este metabolito regula la actividad del factor de transcripción Rim101 (Okagaki *et al.*, 2011), el cual es necesario para inducir células gigantes. Otras proteínas reprimen el crecimiento celular, como las proteínas Gap1, Cnc1560, Cdc420, GTPasa Rho104 y la ciclina G1/S Pcl 103 (Okagaki *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha visto que mutantes de fosfolipasa C pueden formar células gigantes dentro de

los macrófagos (Evans *et al.*, 2015), lo que sugiere que en determinadas situaciones estas células pueden contribuir a la supervivencia intracelular de esta levadura.

1.6.2.1.2 Factores del huésped involucrados en la formación de células gigantes

Un aspecto poco conocido es qué función tienen las células gigantes durante la infección y qué factores del huésped regulan esta transición. Las células gigantes contribuyen a la permanencia de la levadura en el pulmón ya que no pueden ser fagocitadas o eliminadas. Además, inhiben la fagocitosis de otras células de tamaño regular e inducen una respuesta inmune de tipo Th2 (Crabtree *et al.*, 2012; Okagaki and Nielsen, 2012). Se ha demostrado que la proporción de este tipo de células es particularmente alta en modelos de infección asintomática, lo que podría indicar que estas células participan en la fase de latencia (Zaragoza *et al.*, 2010). Además, en ratones knockout *rag1* (que no producen anticuerpos IgM), las células de *C. neoformans* son de mayor tamaño que en ratones silvestres (Szymczak *et al.*, 2013), lo que sugiere que la formación de células gigantes responde a factores de la respuesta inmune.

Por otra parte, los fosfolípidos (en particular la fosfatidilcolina), pueden desencadenar la formación de este tipo de células *in vitro* (Chrisman *et al.*, 2011). Además, La proporción de estas células aumenta cuando se realiza una coinfección con cepas de alelos sexuales MATa y MAT α (Okagaki *et al.*, 2010), lo que indica que el tipo sexual juega un papel importante en la inducción de las células gigantes.

En resumen, la capacidad de *C. neoformans* para cambiar el tamaño celular durante la infección refleja que este microorganismo posee un programa morfogénico peculiar que le confiere adaptación al huésped y contribuye a la enfermedad. A pesar de su importancia y de ser cambios muy característicos asociados a la infección, su papel en virulencia y los mecanismos que los regulan no han sido todavía caracterizados.

1.7 Respuesta inmune frente a *C. neoformans*

La comprensión de la enfermedad causada por *C. neoformans* requiere el conocimiento de la respuesta inmune desarrollada por el huésped (Rohatgi and Pirofski, 2015). En general, la respuesta inmune se compone de respuesta innata y adaptativa. En ambos casos, hay componentes solubles (denominada respuesta humoral), y celulares (respuesta celular). A continuación, se describe brevemente como participan en la defensa frente a *C. neoformans* los principales elementos de cada tipo de respuesta inmune.

1.7.1 Papel de la respuesta innata frente a *C. neoformans*

La primera línea de defensa contra *C. neoformans* está formada por las barreras superficiales, como la piel y las mucosas. Algunos componentes de la defensa innata de estas barreras, como la saliva, tienen actividad contra *C. neoformans* (Baum and Artis, 1961; Igel and Bolande, 1966). Además, la inmunidad innata está compuesta por las proteínas del complemento y péptidos antimicrobianos (respuesta humoral) y células fagocíticas (respuesta celular).

1.7.1.1 Respuesta humoral: complemento y péptidos antimicrobianos

El complemento está compuesto por un grupo de proteínas solubles en la sangre que se activan mediante una cascada de proteólisis en respuesta a agentes exógenos. Como resultado de esta proteólisis, se produce la unión covalente de algunas de estas proteínas a la superficie de partículas extrañas, que pueden inducir la formación de poros en la membrana de microorganismos, o inducir su fagocitosis. *Cryptococcus neoformans* activa el sistema del complemento principalmente a través de la vía alternativa que conduce a la deposición de C3 sobre la cápsula (Diamond *et al.*, 1974). Esta proteína es una de las principales opsoninas que inducen la fagocitosis de *C. neoformans* (Zaragoza *et al.*, 2003a; Diamond *et al.*, 1974). También se ha observado que anticuerpos que se unen a la cápsula promueven la activación de la vía clásica del complemento (Gates and Kozel, 2006; Pirofski, 2006). Además, la lectina de unión a manosas (MBL) puede unirse a la pared celular de *C. neoformans* y activar el complemento a través de la vía de las lectinas (van Asbeck *et al.*, 2008). Se ha demostrado que animales deficientes en complemento son más susceptibles a la infección (Rhodes *et al.*, 1980) y que las proteínas del complemento están reducidas en pacientes con fungemia criptocócica (Macher *et al.*, 1978).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, de sus siglas en inglés) son proteínas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos (Izadpanah and Gallo, 2005). Estos péptidos han sido estudiados como posibles agentes antimicrobianos terapéuticos debido a su amplio espectro de actividad y por la baja capacidad de los microorganismos de desarrollar resistencia. Hay estudios que muestran que la protección contra *C. neoformans* está asociada a un aumento en la producción de AMPs (Wozniak *et al.*, 2014). La IL-17A junto con la IL-22 inducen la producción de AMPs y proteínas de fase aguda como β -defensinas, S100A8, S100A9, lipocalina-2 y la proteína amiloide sérica A3 (SAA3) en células epiteliales bronquiales (Aujla *et al.*, 2008; Gessner *et al.*, 2012; Kolls *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2006; Wolk *et al.*, 2004). S100A8 y S100A9 forman un heterodímero llamado calprotectina (Lagasse and Clerc, 1988; Odink *et al.*, 1987; Zwadlo *et al.*, 1988) que está involucrado en el reclutamiento de neutrófilos (Aujla *et al.*, 2008; Kolls

et al., 2008; Liang *et al.*, 2006) y tiene actividad fungiestática frente a *C. neoformans* (Mambula *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2010; Urban *et al.*, 2009).

1.7.1.2 Respuesta celular: macrófagos, neutrófilos y células dendríticas

En el pulmón, los macrófagos y neutrófilos alveolares constituyen la primera línea de defensa para la contención y eliminación de la infección. El hecho de que *C. neoformans* sea un patógeno intracelular facultativo indica que la interacción con los macrófagos alveolares (MAs) es uno de los factores más relevantes para entender la infección. La depleción de MAs en ratones retrasa la diseminación de *C. neoformans* y mejora la supervivencia de los animales, lo que sugiere que los MAs promueven el crecimiento del hongo y su diseminación (Kechichian *et al.*, 2007). Sin embargo, la depleción de macrófagos es perjudicial en ratas (Shao *et al.*, 2005), lo que indica que la función de los MAs varía según las especies. Los macrófagos pueden promover un tipo de respuesta Th1 y sirven como células presentadoras de antígeno (APC) a los linfocitos T (Vecchiarelli *et al.*, 1994). Los MAs pueden mejorar o controlar la patogénesis de *C. neoformans* dependiendo del estado inmune del huésped (McQuiston and Williamson, 2012). La respuesta del huésped a *C. neoformans* se correlaciona con una polarización de macrófagos (Davis *et al.*, 2013). Una respuesta inmune de tipo Th1 resulta en una polarización a macrófagos M1 (clásicos, proinflamatorios), los cuales tienen una fuerte actividad fungicida (Arora *et al.*, 2005; Hardison *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, una respuesta de tipo Th2 da lugar a una polarización a macrófagos M2 (alternativos, antiinflamatorios), que no pueden contener la replicación de *C. neoformans* (Arora *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Osterholzer *et al.*, 2009).

Por otra parte, los neutrófilos también participan en la defensa frente a *C. neoformans* por su actividad antifúngica y porque favorecen la formación de granulomas (Mambula *et al.*, 2000; Kozel *et al.*, 1987; Miller and Mitchell, 1991). Además, producen AMPs (defensinas) que son citotóxicos para *C. neoformans* (Alcouloumre *et al.*, 1993). Sin embargo, la neutropenia altera la producción de citoquinas en los ratones y reduce su susceptibilidad a una infección pulmonar por *C. neoformans* (Mednick *et al.*, 2003). La ausencia de neutrófilos en el pulmón en los estadios iniciales de la infección parece alterar la respuesta inflamatoria y confiere beneficios al huésped. Por ello, se piensa que los neutrófilos juegan un papel regulador importante en el establecimiento del equilibrio de la respuesta Th1/Th2 durante la criptococosis (Mednick *et al.*, 2003).

Además, las células dendríticas (CD), que están especializadas en la presentación de antígeno y regulación de la producción de citoquinas, también participan en la defensa

frente a *C. neoformans*, ya que presentan actividad antifúngica directa frente a este hongo (Crowley *et al.*, 1990).

1.7.2 Papel de la respuesta adaptativa

La respuesta adaptativa está compuesta principalmente por linfocitos (respuesta celular) y anticuerpos y citoquinas (respuesta humoral). La aparición de la enfermedad en individuos con deficiencia de linfocitos T CD4 destaca el papel de la inmunidad adaptativa frente a *C. neoformans*. Sin embargo, existen evidencias de que los anticuerpos (Abs) pueden conferir protección en infección experimental (Casadevall, 1998; Fleuridor *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 1993).

1.7.2.1 Respuesta humoral: anticuerpos y citoquinas

La concentración de anticuerpos circulantes (Abs) tanto en animales con infección experimental como en humanos con criptococosis es normalmente baja, ya que el GXM inhibe su producción (Casadevall and Scharff, 1991; Deshaw and Pirofski, 1995; Diamond and Bennett, 1974; Kozel *et al.*, 1977; Murphy and Cozad, 1972). Por esta razón, el papel de los Abs en la defensa contra este patógeno es incierto. La administración de anticuerpos monoclonales (mAbs) frente a la cápsula altera la enfermedad causada por *C. neoformans* en ratones (Dromer *et al.*, 1987; Fleuridor *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1990), y pueden conferir protección o favorecer la enfermedad dependiendo de la especificidad e isotipo del Ab, de la cepa de ratón y de la carga fúngica (Maitta *et al.*, 2004; Taborda *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2002; Beenhouwer *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1992). Hay estudios que sugieren que los Abs no protectores dominan la respuesta de Abs en la infección por *C. neoformans* (Zaragoza and Casadevall, 2004).

Por otro lado, las citoquinas son proteínas secretadas que regulan la actividad de otros tipos celulares. Estos mediadores juegan un papel fundamental en la regulación y polarización del sistema inmune. En el caso de *C. neoformans*, se requieren citoquinas de tipo Th1 y de tipo Th17 para mediar una respuesta protectora. La respuesta de tipo Th1 es promovida por la IL-12 y el interferón gamma (IFN- γ). Estas citoquinas, junto con la citoquina proinflamatoria TNF- α , se han asociado con la eliminación del microorganismo y mayor protección (Koguchi and Kawakami, 2002; Zhang *et al.*, 2009). La respuesta de tipo Th17 es promovida por las citoquinas IL-17, IL-6 e IL-23. Al igual que con las citoquinas de tipo Th1, las citoquinas IL-17, IL-22 e IL-23 han sido asociadas con protección frente a la infección (Wozniak *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). En cambio, un tipo de respuesta Th2, promovida por las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, se han asociado con un agravamiento de la enfermedad en modelos animales (Muller *et al.*, 2007).

1.7.2.2 Respuesta celular: linfocitos B y T

La defensa contra *C. neoformans* depende en gran medida de una respuesta adaptativa mediada por células T (CD4 y CD8) (Hill and Harmsen, 1991; Huffnagle *et al.*, 1994; Huffnagle *et al.*, 1991; Kawakami *et al.*, 1996; Kawakami *et al.*, 1999; Mody *et al.*, 1990). *Cryptococcus neoformans* infecta a individuos inmunosuprimidos, principalmente pacientes VIH⁺, con un recuento de linfocitos CD4 por debajo de 50 células/ μ L (Andama *et al.*, 2013; Jarvis *et al.*, 2013). También se ha observado esta infección en pacientes con linfocitopenia de CD4 idiopática, caracterizada por el bajo recuento de este tipo de células sin evidencia de infección por VIH. Estos resultados han sido confirmados en modelos animales, en los que se ha comprobado que la depleción de linfocitos CD4 aumenta la sensibilidad a la infección por *C. neoformans* (Huffnagle *et al.*, 1991; Mody *et al.*, 1990; Hill and Aguirre, 1994; Buchanan and Doyle, 2000). Además, las células CD4 son necesarias para el reclutamiento de macrófagos y granulocitos en los pulmones durante la infección (Huffnagle *et al.*, 1994).

Las células CD8 también juegan un papel importante en la respuesta inmune contra *C. neoformans* (van de Veerdonk and Netea, 2010). Estos linfocitos causan la muerte del hongo mediante la producción de granulicina (Ma *et al.*, 2002). La depleción *in vivo* de células CD8 reduce la supervivencia de ratones infectados (Mody *et al.*, 1994). Además, estas células producen IFN- γ , lo cual contribuye a limitar el crecimiento y la supervivencia de *C. neoformans* en macrófagos (Lindell *et al.*, 2005).

Por otra parte, numerosos estudios indican que los linfocitos B participan en la defensa contra la criptococosis experimental, aunque su función sigue siendo motivo de controversia (Subramaniam *et al.*, 2010a; Rohatgi and Pirofski, 2012; Szymczak *et al.*, 2013). En el primer estudio en el que se utilizó un modelo de depleción de linfocitos B no se observaron diferencias en la sensibilidad de los animales infectados con *C. neoformans* en comparación con los ratones silvestres (Monga *et al.*, 1979). Sin embargo, estudios posteriores indican que ratones KO deficientes de células B son más sensibles a la infección por *C. neoformans* (Rivera and Casadevall, 2005). Por otra parte, las células B fueron el tipo de células predominante en los pulmones de ratones A/JCr infectados con *C. neoformans* (Feldmesser *et al.*, 2002), lo que sugiere que estas células participan en la respuesta frente a este microorganismo, aunque se requieren futuros estudios para elucidar el papel de los linfocitos B y anticuerpos durante la criptococosis.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Cryptococcus neoformans es una levadura de especial interés para estudiar la virulencia fúngica ya que expresa varios factores de virulencia que causan daño al huésped. Además, también ha desarrollado múltiples mecanismos que le permiten adaptarse y evadir la respuesta inmune del huésped. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de la morfogénesis en *C. neoformans*, ya que contribuye a la virulencia, y confiere ventajas al hongo durante la infección. Para ello, hemos utilizado un abordaje multidisciplinar, en el cual no solo hemos intentado caracterizar los mecanismos que regulan la morfogénesis (crecimiento de la cápsula y formación de células gigantes), sino que también hemos tratado de investigar como la respuesta inmune influye en la morfogénesis de *C. neoformans*.

En este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- 2.1 Caracterizar la dinámica de la síntesis y crecimiento capsular en *C. neoformans* y estudiar la virulencia de mutantes que no pueden aumentar el tamaño de la cápsula.
- 2.2 Definir factores que inducen la formación de células gigantes en condiciones *in vitro*.
- 2.3 Identificar genes que cambian su expresión durante la formación de células gigantes usando secuenciación masiva del ARN.
- 2.4 Estudiar la influencia de factores del huésped en la formación de células gigantes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos y técnicas microbiológicas

3.1.1 Cepas de *Cryptococcus*.

En la mayoría de los experimentos realizados en este trabajo se utilizó la cepa de *C. neoformans* var. *grubbi* H99 (ATCC 208821) (Perfect *et al.*, 1980). También se han utilizado las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* B3501 (Kwon-Chung, 1976) y *C. neoformans* var. *grubii* KN99 (Nielsen *et al.*, 2003). Además, se utilizaron aislados clínicos de *C. neoformans* y *C. gattii* disponibles en la colección de levaduras del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Por último, se han utilizado diferentes mutantes obtenidos de la colección depositados en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) por el Dr. Madhani (Liu *et al.*, 2008). Todas las cepas utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 3.1.

3.1.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras se conservaron en 30 % de glicerol con Sabouraud (Oxoid, Reino Unido) a -80 °C, y se recuperaron en medio Sabouraud sólido a 30 °C.

Las levaduras se cultivaron en medio Sabouraud líquido a 30 °C con una agitación de 150 r.p.m. También se utilizó medio mínimo YNB (Dickinson and Company, Le pont de Glaix, Francia) suplementado con glucosa o galactosa al 2 %. Para la preparación de medios sólidos, se añadió 1,5 % de agar bacteriológico (Difco).

Para la inducción de la cápsula de *C. neoformans* se utilizó 10 % de Sabouraud tamponado a pH 7,3 con MOPS 50 mM (ácidomorfolinopropanosulfónico, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA), a 37 °C durante una noche (Zaragoza and Casadevall, 2004). En algunos experimentos, este medio se preparó sustituyendo el 10% de Sabouraud por peptona 0,2 % + galactosa 0,4 %.

Para la obtención de células gigantes *in vitro*, las levaduras se inocularon en un medio que hemos definido como TCM (de las siglas en inglés *Titan Cell Medium*) y que contiene 5 % de Sabouraud, 5 % suero bovino fetal (FBS) tamponado con 50 mM de MOPS y suplementado con azida de sodio 15 μ M a pH 7,3. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO₂ durante una noche.

Tabla 3.1. Listado de cepas utilizadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Referencia
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (serotipo A)	H99 (ATCC 20882) CL-5659 3259 KN99 (MAT α) 3260 KN99 (MAT α) <i>gat201</i> <i>cln1</i> (CNAG_06092) <i>cln1::CLN1</i> <i>car1</i> (CNAG_02500) <i>gtl1</i> (CNAG_03648) <i>can1</i> (NE 411) <i>can2</i> (NE 417) RPC3 (<i>cac1::URA5</i>) RPC7 (<i>cac1::URA5/CAC1</i>)	Perfect <i>et al.</i> , 1980 Servicio de Micología (CNM) Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Liu <i>et al.</i> , 2008 Liu <i>et al.</i> , 2008 García-Rodas <i>et al.</i> , 2014 Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Guilhem Janbon (Institut Pasteur) Alspaugh <i>et al.</i> , 2002 Alspaugh <i>et al.</i> , 2002
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (serotipo D)	ATCC 24067 B3501 CL-6435 CL-6760 JEC20 JEC21 NE 822 NE 824 C538 (<i>cap59</i>) <i>cap60</i> (CNAG_00600)	American Type Culture Collection, Kwon-Chung, 1976 Servicio de Micología (CNM) Servicio de Micología (CNM) Sheng Sun and Jianping Xu, 2007 Sheng Sun and Jianping Xu, 2007 Wollschlaeger <i>et al.</i> , 2014 Wollschlaeger <i>et al.</i> , 2014 Chang <i>et al.</i> , 1995 Chang and Kwon-Chung, 1998
<i>C. neoformans</i> híbrido (serotipo A/D)	CL-4041 CL-4840 CL-5706 CL-6434	Servicio de Micología (CNM) Servicio de Micología (CNM) Servicio de Micología (CNM) Servicio de Micología (CNM)
<i>C. gattii</i> (serotipo B/C)	NIH 191 NIH 198 CBS-10514 (R265) CBS-10865 (R272)	NIH, Bethesda, Maryland NIH, Bethesda, Maryland Kidd <i>et al.</i> , 2004 Kidd <i>et al.</i> , 2004

3.1.3 Crecimiento en medio sólido

Se prepararon suspensiones de levaduras a una concentración de 10^6 células/mL en PBS. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en el mismo tampón y se inocularon 10 μ L de cada una de ellas sobre placas de medio sólido por duplicado. Las placas se incubaron durante 48 ó 72 horas a 30 ó 37 °C. Las placas se observaron y se tomaron fotos a diario usando una cámara digital (D60 Nikon).

3.1.4 Técnicas microbiológicas

3.1.4.1 Curvas de crecimiento

Para caracterizar el crecimiento de las levaduras, las células se inocularon en Sabouraud líquido a 30 °C con agitación durante una noche. Los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS y la concentración celular se determinó con un hemocitómetro o un contador de células automático (TC20 Automated Cell Counter, Bio Rad). A continuación, se preparó una suspensión de células a una concentración de 2×10^5 células/mL en diferentes medios dependiendo del experimento. De esta suspensión se inocularon 170 μ L por triplicado en placas de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York) que se incubaron a 30 y 37 °C en un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MS (Thermofisher). La densidad óptica (D.O.) a 540 nm se registró cada hora durante 48 o 72 horas. Los datos se analizaron con Graph Pad Prism 6 y los resultados se representaron mediante gráficas (D.O. vs. tiempo).

3.1.4.2 Fijación de células

La fijación de células se realizó con p-formaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) preparado en PBS. Para la fijación, se prepararon suspensiones de células a una concentración de 10^6 células/mL, se centrifugaron a 3.000 g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, el sedimento se resuspendió en 500 μ L de p-formaldehído al 4 % y se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Por último, se centrifugó de nuevo a 3.000 g durante 3 minutos y se suspendieron las células en 200 μ L de PBS. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

3.2 Tinciones

3.2.1 Tinción negativa con tinta china

Para visualizar la cápsula de *C. neoformans*, se depositaron 10 μ L de las suspensiones celulares sobre un portaobjetos y se añadió una gota de tinta china (Remel Bactidrop, Lenexa, Kansas). A continuación, se colocó un cubreobjetos de 24x40 mm (Menzel-Gläser) sobre el portaobjetos y finalmente se observó al microscopio óptico Leica DMI 3000B. La cápsula de *C. neoformans* se observó como un halo blanquecino alrededor del cuerpo celular debido a la exclusión de la tinta china.

3.2.1.1 Medida del tamaño celular y capsular

Para la medida del tamaño celular y de la cápsula se tomaron fotos de las preparaciones descritas en el apartado anterior utilizando una cámara Leica DFC 300FX

conectada a un microscopio Leica DMI 3000B usando el software Leica Application Suite (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop 7.0 (San José, California). El tamaño total de la célula se definió como el diámetro de la célula incluyendo la cápsula. El tamaño de la cápsula se calculó como la diferencia entre el tamaño total de la célula y el tamaño del cuerpo celular definido por la pared celular.

3.2.2 Tinción de la pared celular con calcofluor

Para visualizar la pared celular se utilizó calcofluor (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), el cual se une a la quitina y emite fluorescencia azul. Para ello, una suspensión de aproximadamente 10^6 células/mL en PBS se incubó con calcofluor (10 $\mu\text{g/mL}$) durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Trascurrido ese tiempo las células se lavaron 2 veces con 100 μL de PBS y se centrifugaron a 3.000 g durante 3 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 μL de PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000B.

3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta de la cápsula

En algunos experimentos, la cápsula se visualizó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ello, en primer lugar se marcó la pared celular con calcofluor tal y como se describe en el apartado anterior. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS + seroalbúmina bovina 1 % (BSA). Las levaduras se suspendieron en el mismo tampón y se incubaron con el anticuerpo primario de ratón 2H1 (IgG1, 10 $\mu\text{g/mL}$) (Casadevall *et al.*, 1992), el cual se une al GXM de la cápsula. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se lavaron dos veces con 100 μL de PBS + BSA 1 % y se centrifugaron a 3.000 g durante 3 minutos. Tras suspender las células en 100 μL de PBS + BSA 1 %, se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron nuevamente 1 hora a 37 °C protegidas de la luz. Finalmente, las células se lavaron dos veces con 100 μL de PBS + BSA 1 %, se centrifugaron a 3.000 g durante 3 minutos, y se suspendieron en 100 μL de PBS. Las células se observaron en un microscopio óptico de fluorescencia (Leica DMI 3000B).

3.3 Inhibidores de la fosforilación oxidativa

Los inhibidores de la fosforilación oxidativa utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 3.2, así como las concentraciones que se evaluaron y los solventes en los que fueron preparados (Alonso-Monge *et al.*, 2009). La Antimicina A y Oligomicina se almacenaron a -20 °C y el resto a temperatura ambiente. Las soluciones de trabajo se prepararon al 2x, en cámara química de gases, con guantes y máscara facial protectora.

Tabla 3.2. Inhibidores de la fosforilación oxidativa y soluciones stock utilizadas en este trabajo. Todos ellos se adquirieron a Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri.

Inhibidor	Solvente	Concentraciones a evaluar	Solución stock
Antimicina A	Etanol (96%)	3,6-1,8-0,9-0,45-0,22 μ M	1,82 mM
Cianuro potásico (KCN)	H ₂ O	20-10-5-2,5-1,25 mM	80 mM
ácido salicilhidroxámico (SHAM)	Etanol (96%)	4-2-1-0,5-0,25 mM	160 mM
Oligomicina	Etanol (96%)	15,16-7,58-3,79-1,89-0,94 μ M	1,26 mM
Azida de sodio (NaN ₃)	H ₂ O	7,6-3,8-1,9-0,95-0,47 mM	150 mM
Rotenona	DMSO (100%)	250-125-62,5-31,25-15,6 μ M	100mM

3.3.1 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se evaluó usando la sonda fluorescente Rodamina 123 (Invitrogene), la cual se internaliza y se acumula en el interior de la mitocondria por un proceso dependiente del potencial de membrana. Las levaduras se inocularon en Sabouraud líquido. Las células fueron recogidas por centrifugación a 3.000 g, lavadas con PBS y suspendidas en medio de inducción de la cápsula a una concentración de 10^6 células/mL. Diez mL de estas suspensiones se incubaron durante 3, 6 y 24 horas a 37 °C. Una vez transcurrido cada tiempo, se tomaron 500 μ L del inóculo y se prepararon en un tampón 50 mM de citrato de sodio y glucosa al 2 % y se agregó Rodamina 123 a una concentración de 35 μ M. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. A continuación, la intensidad de fluorescencia de las células fue cuantificada en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD) en el canal FL-3, con los programas CellQuest (BD, Biosciences) y FlowJo (Tree star Inc OR, USA).

3.4 Obtención de células gigantes para realizar la secuenciación masiva del ARN (RNAseq) *in vitro* y condiciones de elutriación

Para la obtención de células gigantes *in vitro*, las levaduras se inocularon en 10 mL de Sabouraud líquido (Oxoid, Reino Unido) con azida de sodio 15 μ M (preparada en PBS estéril) a 30 °C con una agitación de 150 r.p.m durante una noche. A continuación, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 3.000 g durante 3 minutos en una

centrífuga Hermle z400K. Se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 10^8 células/mL. Las células se incubaron a 37 °C y a 150 r.p.m durante 3 días como se detalla a continuación. Diariamente, los cultivos fueron centrifugados y lavados como se ha descrito previamente y 50 µL fueron re-inoculados en 10 mL de medio fresco TCM en Erlenmeyer de 100 mL. El último día, se re-inoculó 1 mL de los cultivos en 100 mL de medio TCM para conseguir una mayor cantidad de células gigantes. En paralelo, las células se inocularon en medio Sabouraud líquido con azida de sodio 15 µM y se cultivaron en las mismas condiciones como control de células de tamaño normal. Algunos de los experimentos con células gigantes se realizaron en placas de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York) con una concentración de células de 10^4 células/mL y fueron incubadas a 37 °C con CO₂ durante 24 horas.

La elutriación es un proceso de separación de células según su tamaño, forma o densidad, ampliamente utilizado en experimentos de análisis de ciclo celular.

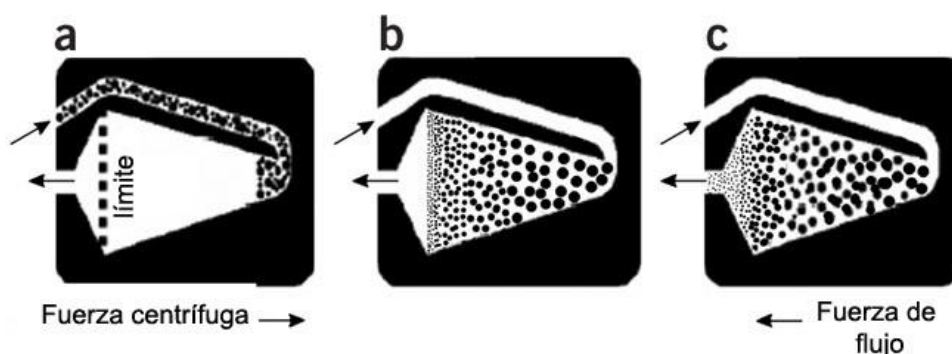


Figura 3.1. Sistema de elutriación. Figura modificada de Gaspar Banfalvi (2008). La fuerza centrífuga y la fuerza de flujo actúan en dirección opuesta. a, b y c ilustran los principios de la elutriación. a) la suspensión de células entra en la cámara. b) la fuerza de centrifugación y la fuerza de flujo mantiene a las células dentro de la cámara. c) El aumento de la fuerza de flujo hace salir las células de menor tamaño en primer lugar seguidas de las células de mayor tamaño.

Las suspensiones celulares se introdujeron en la cámara del elutriador Avanti® J Series instrument (Beckman Coulter) a 4 °C y se centrifugaron a 2.228 g y una fuerza de flujo de 50 mL/min, donde se van depositando según su tamaño (ver figura 3.1). Las células se recogieron en diferentes fracciones de 100 mL en hielo incrementando gradualmente la velocidad de flujo. En todos los experimentos se recogieron un total de 10 fracciones que fueron centrifugadas a 3.000 g. La eficacia de la elutriación fue confirmada por visualización al microscopio utilizando tinciones de tinta china como se describe en el apartado 3.2.1 y mediante citometría de flujo como se describe en el apartado 3.7.2. Aquellas fracciones que contenían células de similar tamaño se juntaron

para obtener mayor número de células. Las condiciones de elutriación se describen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Condiciones utilizadas en el proceso de separación de células gigantes mediante elutriación.

Condiciones elutriación			
Fases	Fracciones de recogida	Velocidad de centrifugación (g)	Fuerza flujo (mL/min)
Entrada de células	-	2.228	50
Salida de células			
Células pequeñas	1	2.121	50
	2	1.786	50
	3	1.507	50
	4	1.284	50
	5	1.060	50
	6	837	50
	7	837	80
Células gigantes	8	670	80
	9	502	80
	10	279	80
	11	Parada	80

3.5 Extracción de lípidos polares

Para la extracción de lípidos de suero bovino fetal (HyClone-Perbio, Thermo Fisher Scientific), se tomó 1 ml de suero y se incubó con una mezcla de cloroformo/metanol en una proporción 2:1 durante 3 horas a temperatura ambiente en un agitador de mesa (IKA® Schuttler MTS4). A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13.800 g en una centrífuga Biofuge fresco (Heraeus). La fase superior (lípidos polares) fue transferida a tubos de 1,5 mL y se secaron en una centrífuga con vacío (SpeedVac Concentrator, Thermo electron corporation) durante 1 hora. Los precipitados fueron disueltos en 200 µL de PBS y guardados a 4 °C hasta el momento del uso.

3.5.1 Purificación y efecto de fosfolípidos polares del suero en la formación de células gigantes

Para evaluar el efecto de los fosfolípidos del suero en la formación de células gigantes, las levaduras crecieron durante una noche a 30 °C en Sabouraud. Al día siguiente, se prepararon suspensiones de células a 10^4 y 10^6 células/mL en medio TCM en el que el suero se sustituyó por diferentes cantidades de fosfolípidos (diluciones 1:40, 1:100 y 1:200 del extracto original). Como control se preparó el mismo medio con las mismas cantidades de PBS. En paralelo, se prepararon las suspensiones de células en Sabouraud y en medio TCM como control de crecimiento y de formación de células gigantes respectivamente. Estas suspensiones se inocularon por duplicado en placas de microdilución de 96 pocillos (170 μ L por pocillo) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante una noche. Al día siguiente, se observaron con un microscopio Leica DMI 3000B.

3.5.2 Evaluación del efecto del Farnesol en la formación de células gigantes

Para evaluar el efecto del Farnesol (Sigma-Aldrich), se utilizó el protocolo descrito en (Cordeiro Rde *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. El farnesol se preparó a una concentración de 400 mM en 7,5 % de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A continuación, se preparó una dilución de Farnesol en DMSO a una concentración de 15 mM. Se hicieron diluciones seriadas 1/2 del Farnesol en DMSO a 3,75 % hasta una concentración final de 0,029 mM. Después, se hicieron diluciones 1/50 de cada dilución en placas de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York) con las levaduras (10^4 células/mL) en Sabouraud y TCM (volumen final de 170 μ L). Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. De esta manera, el rango de concentraciones finales del farnesol analizadas en la formación de células gigantes fue de 300 μ M a 0,5 μ M, manteniendo en todos los casos una concentración final de DMSO de 0,075 %. Como control, se llevaron pocillos con DMSO 0,075% tanto en TCM como en Sabouraud. Las placas se observaron en un microscopio Leica DMI 3000B. En otros experimentos, la placa se colocó en un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MS (Thermofisher), y se realizaron curvas de crecimiento tal y como se indica en el apartado 3.1.4.1.

3.5.3 Visualización de la formación de células gigantes en tiempo real

Para observar la formación de células gigantes *in vitro* en tiempo real se realizaron videos utilizando un microscopio Leica CTR 4000 que tenía una cámara acoplada que permitió incubar a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Las levaduras se inocularon en medio TCM a 10^4 células/mL como se indica en el apartado 3.4, y se inocularon en placas de microdilución de 96 pocillos. Se tomaron fotos cada 3 minutos

durante 24 horas con el objetivo 20x y los videos generados se realizaron con el software LAS AF (Leica Microsystems) y se analizaron con el programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.6 Modelos de interacción con el huésped

3.6.1 Modelo de ratón

3.6.1.1 Cepas de ratón

Se utilizaron ratones machos de 6-8 semanas de edad de las cepas CD1 (Charles River Laboratories), C57BL/6J (Estabulario del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III o Charles River Laboratories) y knockout (KO) homocigoto para IL-17A ($Il17a^{-/-}$) en fondo genético C57BL/6J (generados en el Centro de Medicina Experimental y Biología de Sistemas, Universidad de Tokio, Minato-Ku, Tokio, Japón). Los ratones $Il17a^{-/-}$ pudieron ser utilizados en este proyecto gracias a la visita que se realizó al laboratorio de la Dra. Anna Vecchiarelli (Universidad de Perugia, Italia). Dependiendo del experimento, los animales se separaron en grupos de 5 o 6 ratones por jaula y se mantuvieron a 22-24 °C. Se incluyeron casas, cilindros y virutas de cartón (Sodispan, España) como enriquecimiento ambiental. Todos los procedimientos utilizados fueron aprobados por el Comité de ética y bienestar animal del Instituto de Salud Carlos III (CBA2014_PA51) y de la Comunidad de Madrid (PROEX 330/14), tal y como requiere el Real Decreto 53/2013.

3.6.1.2 Anestesia

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (Imalgene 1000 ®, 5 mg/mL) y Xilacina (Xilagesic 2 % ®, 2 mg/mL) preparada en PBS. Se administraron 0,1 mL por cada 10 gramos de peso, de modo que la Ketamina se administró a 50 mg/Kg y la Xilacina a 20 mg/Kg.

3.6.1.3 Preparación de inóculo e infección intranasal

La cepa H99 se inoculó en Sabouraud líquido a 30 °C con agitación. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 3.000 g en una centrífuga Hermle z400K y se lavó y se suspendió en PBS estéril. La densidad celular se calculó utilizando el contador de células TC20 (BioRad) y se prepararon suspensiones celulares a $3,33 \times 10^7$ células/mL en PBS.

Para realizar la infección intranasal, los ratones anestesiados se mantuvieron en posición vertical y 30 µL de la suspensión celular fueron colocados sobre las fosas

nasales (10^6 células/ratón). A continuación, los ratones fueron colocados de lado en posición horizontal bajo luz para mantener su temperatura corporal.

3.6.1.4 Seguimiento del bienestar animal y sacrificio

El seguimiento del bienestar animal se realizó pesando los ratones cada 3 días hasta su sacrificio. Cada día se asignó un índice de bienestar animal según los siguientes parámetros: pérdida de peso, pelaje irregular, instinto de huida, encorvamiento y abultamiento de la cabeza (ver tabla 3.4). Cuando a un ratón se le asignó un valor igual o mayor de 6, se procedió a su sacrificio por razones humanitarias. Si no, los ratones se sacrificaron a días diferentes tras la infección dependiendo del experimento mediante inhalación de CO_2 . En algunos experimentos, los ratones fueron sacrificados por inhalación de isofluorano (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemania).

Tabla 3.4. Parámetros observados e índice arbitrario asignado para el seguimiento del bienestar animal.

% Pérdida de peso		Pelaje irregular		Instinto de huida		Encorvamiento corporal		Abultamiento cabeza	
Medida	Valor	Obser.	Valor	Obser.	Valor	Obser.	Valor	Obser.	Valor
5-10%	1	normal	0	sí	0	no	0	no	0
11-15%	2	erizado	1	no	1	sí	1	sí	1
16-20%	3								
21-25%	4								
>25%	6								

3.6.1.5 Extracción de órganos y aislamiento de las células de *C. neoformans* a partir de los pulmones

Una vez sacrificados los ratones, se abrió la cavidad torácica y se extrajeron los pulmones, bazo o cerebros con unas pinzas. Para estimar el tamaño de los órganos, se calculó el índice organosomático que expresa el porcentaje que supone el peso del órgano con respecto al peso total del ratón.

Para aislar las levaduras de ratones infectados, los pulmones fueron homogeneizados en 10 mL de PBS usando filtros con un tamaño de poro de 100 μm (BD Falcon, Biosciences) en placas Petri. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 3.000 g y se lavó con agua destilada estéril para romper y eliminar las células de ratón. Esta operación se repitió 3 veces y finalmente, las levaduras se suspendieron en PBS.

En ocasiones, se llevó a cabo una perfusión para eliminar la sangre de los pulmones. Para este propósito, se realizó un corte en la vena yugular. Después, se localizó el corazón en la cavidad torácica, y se inyectaron lentamente 5-10 mL de PBS en el ventrículo izquierdo del corazón. De esta manera, se observó gradualmente como los pulmones adquirían un color blanquecino. Tras este proceso, se procedió a extraer los pulmones como se ha indicado anteriormente. La técnica de perfusión solo se realizó en los experimentos en los que se purificaron las células de *C. neoformans* para investigar la expresión génica mediante secuenciación masiva del ARN.

3.6.1.6 Extracción de sangre y obtención de suero

La extracción de sangre se realizó mediante punción cardiaca usando jeringas de 1 mL (Becton Dickinson Plasticpak) y agujas de 25G (Becton Dickinson Microlance). Para la obtención del suero, la sangre se centrifugó en tubos eppendorf de 1,5 mL a 13.800 g en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.6.1.7 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFCs)

La carga fúngica de los ratones infectados se determinó por recuento de UFCs. Los pulmones y los cerebros de los ratones fueron homogeneizados en 10 mL de PBS estéril usando filtros de 100 µm (BD, Falcon) con ayuda de un émbolo de una jeringa de 5 mL. El homogeneizado fue incubado a 37 °C durante 1 hora, agitando con vortex cada 15 minutos para favorecer la disgregación del tejido. A continuación, la suspensión se lavó 3 veces con PBS, se prepararon diluciones seriadas en el mismo tampón, y 100 µL fueron inoculados en placas de agar Sabouraud por duplicado. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30 °C. Trascurrido este tiempo, se realizó el recuento de UFCs de cada órgano.

3.6.1.8 Estudio de la morfología fúngica

Para determinar la morfología de las células del pulmón, 4 µL del homogeneizado del pulmón, obtenidos como se ha descrito en el apartado anterior, se mezclaron con tinta china (Remel Bactidrop). Las muestras se observaron y las células fueron medidas como se ha descrito en los apartados 3.2.1 y 3.2.1.1 respectivamente. Se midieron un mínimo de 50 células por ratón.

3.6.1.9 Histología

Para analizar la estructura microscópica del pulmón, se tomó una pequeña porción y se fijó en formalina (10 %). A continuación, las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina siguiendo protocolos estándar del Servicio de Histología de la Universidad de Perugia. De cada muestra se obtuvieron cortes de 3-5 μm que fueron colocados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina/eosina. Por último, las muestras fueron observadas con un microscopio Leica DMI 3000B.

3.6.1.10 Medida de la concentración de citoquinas en pulmón y cerebro

Para medir la concentración de diferentes citoquinas, los experimentos se realizaron de forma diferente dependiendo de si las citoquinas se cuantificaron en nuestro laboratorio o en la Universidad de Perugia. En ambos casos, se inocularon ratones con 10^6 células de *C. neoformans* H99 o con PBS como control. En Italia, los órganos fueron homogeneizados en 2 mL de PBS estéril y fueron centrifugados a 3.000 g usando una centrífuga Allegra™ 6R (Beckman Coulter, USA). El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos, que se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización. Las siguientes citoquinas fueron evaluadas, para el tipo de respuesta Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e IL-6), para el tipo de respuesta Th2 (IL-4 e IL-10) y para el tipo Th17 (IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23). Para ello, se utilizaron los kit ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience, Inc, San Diego, CA). En nuestro laboratorio, los órganos fueron homogeneizados en PBS con inhibidores de proteasas (Roche, Diagnostics) usando un homogeneizador Politron PT1600E (Kinematica AG) con 4 ciclos a la máxima velocidad con 1 minuto de incubación en hielo entre cada ciclo. El extracto se centrifugó a 13.800 g en una centrífuga Hermle z400k y al igual que en Italia el sobrenadante se mantuvo congelado hasta su uso. La concentración de citoquinas se evaluó usando el Kit CYTOMAG multiplex (Millipore) y la tecnología Luminex Xmap utilizando el sistema BioPlex 200 system (BioRad). Se midieron por este sistema las citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 y TNF- α . La concentración de citoquinas se expresó en pg/mL en ambos casos.

3.6.1.11 Medida de anticuerpos anti-GXM en suero

La cantidad de anticuerpos circulantes anti-GXM se determinó mediante un ensayo de ELISA, como se describe en (Casadevall *et al.*, 1992). Se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno que fueron recubiertas con polisacárido capsular (GXM) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, el cual fue purificado como se describe en (Cherniak *et al.*, 1991). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se eliminó el contenido del pocillo. A continuación, se añadieron 200 μL de BSA 1 % en PBS a cada

pocillo y la placa se incubó otra hora a 37 °C. Setenta y cinco microlitros de una dilución 1/3 de las muestras de suero en PBS/BSA se inocularon en el primer pocillo de la placa de microdilución y se hicieron diluciones seriadas 1/3 en PBS/BSA. Después de 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron 3 veces en un lavador de placas (Dynex Ultra Wash Plus washer, Magellan, Biosciences) con PBS con 1 % de Tween 20. Posteriormente, se añadieron 50 µL a cada pocillo de anti-IgG o anti-IgM de cabra anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Southern Biotech). Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C y se lavaron como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se añadieron a cada pocillo 50 µL de una solución de p-nitrofenilfosfato (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) disuelto en el tampón de sustrato (1mM Cl_2Mg ; 50 mM K_2CO_3 , pH 9.6). Tras 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 405 nm en un espectofotómetro Labsystems iEMS Reader MS (Thermofisher). El título de anticuerpo se definió como la dilución del suero que proporcionó el doble de absorbancia de los pocillos blanco.

3.6.1.12 Determinación de la concentración total de IgE en suero

Para medir la concentración total de IgE en las muestras de suero se utilizó el reactivo comercial OptEIA Mouse IgE Elisa Kit (BD, Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 450 nm en un espectofotómetro Labsystems iEMS Reader MS (Thermofisher). Los datos obtenidos se expresaron en ng/mL.

3.6.1.13 Identificación de diferentes tipos de células inmunes

Para identificar diferentes tipos de células inmunes, los pulmones y los cerebros, fueron homogeneizados en 2 mL de PBS utilizando filtros de 100 µm (BD, Falcon). A continuación, se centrifugaron a 3.000 g en una centrifuga Allegra™ 6R (Beckman Coulter, USA). Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 mL de PBS y se prepararon suspensiones a 10^6 células/mL en tubos de citómetro de flujo. Las células se lavaron y se fijaron en p-formaldehído 1,5 % durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron y se suspendieron en PBS. Para los marcajes celulares, se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-mouse CD3e (PE) (0,2 mg/mL) para marcar los linfocitos, Anti-mouse Ly-6R (Gr1) (FITC) (0,5 mg/mL) para las células polimorfonucleares (eBioscience, Inc, San Diego, CA) y Anti-mouse CD14 (PE) para los monocitos y macrófagos (BD, Biosciences). Como controles se añadieron tubos sin marcar y tubos incubados con anticuerpos control (anti-mouse IgG conjugado a PE o anti-mouse IgG conjugado a FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Los tubos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se añadieron 500 µL del tampón FB (PBS+FBS) y se centrifugaron de nuevo los tubos. Finalmente, se

añadieron 500 µL de tampón FB y se procedió al análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur. Para cuantificar el número de linfocitos, granulocitos y monocitos, se realizaron histogramas y se contaron el número de células marcadas con cada anticuerpo. Los datos se representaron como número de células marcadas por pulmón.

3.6.2 Líneas celulares

En este trabajo, se han realizado experimentos con 2 tipos de macrófagos diferentes: macrófagos de la línea celular RAW 264.7 y macrófagos peritoneales primarios de ratones C57BL/6J.

La línea celular RAW 264.7 (Raschke *et al.*, 1978) deriva de macrófagos aislados de abscesos tumorales inducidos en ratones mediante inyección intraperitoneal del virus Abelson, que induce leucemia de ratones (A-MuLV). Estos macrófagos presentan la ventaja de ser inmortales y por lo tanto la posibilidad de mantenerlos en cultivo permanentemente. Esta línea celular se mantuvo congelada a -80 °C.

Los macrófagos primarios peritoneales son células muy diferenciadas, no se dividen y por lo tanto no se pueden mantener en cultivo más de 3 o 4 días. Para su obtención, se utilizaron 2-3 ratones machos C57BL/6J de 6-8 semanas de edad. Cuatro días antes de la extracción, se les inyectó intraperitonealmente 2,5 mL de tioglicolato 3 % (BD, Difco™), lo que impulsa la migración de monocitos al peritoneo y eleva el rendimiento de la extracción de macrófagos alrededor de 10 veces. El día de la extracción, los ratones fueron sacrificados por inhalación de isofluorano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), tras lo cual se les retiró la piel del vientre y se les inyectó en la cavidad peritoneal 10 mL de medio de cultivo compuesto por Dubelcco's modified Eagle's médium (DMEM, Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Hyclone-Perbi, Thermo Fisher Scientific) inactivado por calor (30 minutos a 56 °C), 10 % de medio NCTC (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 1 % de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

A continuación, se les aplicó un masaje sobre la zona durante unos 10 minutos. Tras el masaje, se recuperó el líquido ascítico con una jeringa de 5 mL (Becton Dickinson Plasticpak) y agujas de 25G (Becton Dickinson Microlance) y se centrifugó durante 5 minutos a 1.265 g. El sedimento obtenido (constituido por macrófagos y linfocitos) se suspendió en el medio de cultivo descrito anteriormente, sembrando las células en una placa de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York).

3.6.3 Cultivos celulares

Los macrófagos se mantuvieron en medio DMEM suplementado descrito en el apartado anterior, a 37 °C en una atmósfera enriquecida con 5% CO₂.

3.6.4 Fagocitosis *in vitro* con macrófagos peritoneales primarios

Tras extraer los macrófagos de la cavidad peritoneal, se calculó la densidad celular utilizando un hemocitómetro, se prepararon suspensiones celulares a 5×10^5 células/mL y se sembraron 200 µL en placas de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York). Las células se mantuvieron durante 3 horas a 37 °C con 5 % de CO₂ para que los macrófagos se adhirieran a la placa. Trascurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS frío para eliminar las células no adheridas. Se añadieron 200 µL de medio fresco y los macrófagos se incubaron durante una noche a 37 °C con 5 % de CO₂. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y se inocularon 200 µL de las suspensiones de *C. neoformans* preparadas en medio de cultivo DMEM a una concentración de 5×10^5 células/mL con 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 (Casadevall *et al.*, 1992). De esta manera, se estimó que la proporción entre levaduras y macrófagos fue de 1:1. La fagocitosis se llevó a cabo a diferentes tiempos (0 y 24 horas) a 37 °C y 5 % de CO₂. Trascurridos los diferentes tiempos, se retiró el medio suavemente con una pipeta, con cuidado de no arrastrar la monocapa adherente de macrófagos. Este medio, que contenía las levaduras no internalizadas se transfirió a un eppendorf de 1,5 mL. Después, se llevó a cabo la lisis de los macrófagos adheridos al pocillo añadiendo 200 µL de H₂O. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se transfirió todo el contenido del pocillo (que contenía las levaduras que estaban fagocitadas) a un eppendorf de 1,5 mL. Se hicieron diferentes diluciones en PBS dependiendo del tiempo, y se inocularon 100 µL en placas de Sabouraud. Tras incubar las placas a 30 °C durante 48 horas se cuantificó el número de UFCs. Se inocularon pocillos por triplicado para cada condición.

3.6.5 Fagocitosis *in vitro* con macrófagos RAW 264.7

Las células se mantuvieron como se describe en el apartado 3.6.3 en placas Petri de cultivo celular (Falcon, BD), y se separaron a placas nuevas cuando llegaron a ser confluentes. El día anterior al experimento, la monocapa de macrófagos se separó de la placa mediante pipeteo constante con medio de cultivo, y las células se centrifugaron a 1.265 g en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus). Se prepararon suspensiones celulares a $2,5 \times 10^5$ células/mL, ya que esta línea celular se divide cada 12 horas, por lo que se estimó que tras una noche de incubación, la concentración celular fue alrededor

de 5×10^5 células/mL. Se inocularon 200 μ L por pocillo en placas de microdilución y se incubaron una noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, la placa se inoculó con *C. neoformans* tal y como se ha descrito en el apartado anterior con 10 μ g/mL de anticuerpo 18B7. La fagocitosis se llevó a cabo durante 2 horas. A continuación, se contaron 100 macrófagos por muestra usando un microscopio Leica DMI 4000B y se calculó el índice de fagocitosis como el porcentaje de macrófagos con levaduras en su interior con respecto al total de macrófagos.

3.6.6 Modelo de *Galleria mellonella*

3.6.6.1 Infección de *G. mellonella*

Las larvas de *G. mellonella* fueron infectadas con diferentes dosis de patógeno (10^4 - 10^6 células/larva) dependiendo del experimento tal y como se describe en (Mylonakis *et al.*, 2005; Garcia-Rodas *et al.*, 2011). Para cada ensayo, se utilizaron grupos de 20 larvas (R. J. Mous Livebait, Holanda o Alcotán, Valencia, España) con un peso entre 0,2 y 0,4 gramos.

Para la infección, las levaduras crecieron en Sabouraud líquido a 30 °C con una agitación de 150 r.p.m durante una noche. Tras lavar con PBS, se prepararon suspensiones celulares en el mismo tampón suplementado con ampicilina (20 μ g/mL) utilizando un contador de células automático TC 20 (Automated Cell Counter, Bio-Rad).

Para la inoculación, el abdomen de la larva se limpió con etanol 70 % con un hisopo, y las suspensiones de levaduras fueron introducidas a través de la última propata derecha con una jeringa Hamilton de 10 μ L (Halmilton, USA).

3.6.6.2 Experimentos de supervivencia

Para evaluar la supervivencia de *G. mellonella* infectada con *C. neoformans*, se inocularon grupos de 20 larvas por cepa como se ha descrito en el apartado anterior y se incubaron a 30 o 37 °C durante 7-10 días. La supervivencia se evaluó diariamente y cada experimento se realizó al menos 3 veces en días distintos. Una larva se consideró muerta cuando no respondió al estímulo sobre el cuerpo con una pinza.

En paralelo, se inocularon los siguientes grupos control: un grupo de 10 larvas inoculadas con PBS-ampicilina y un grupo de 10 larvas sin ninguna manipulación.

Las curvas de supervivencia fueron realizadas con el programa Graph Pad Prism 6 (La Jolla, California).

3.6.6.3 Fagocitosis *in vivo*

Para el estudio de la fagocitosis *in vivo* en *G. mellonella*, se prepararon suspensiones de levaduras a una concentración de 10^8 células/mL en PBS y se tiñeron con calcofluor (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) a una concentración de 10 µg/mL. Las muestras fueron incubadas 30 minutos a 37 °C y protegidas de la luz. Tras ese tiempo, las células se lavaron con PBS y se suspendieron en el mismo volumen de PBS/ampicilina para mantener la concentración celular de 10^8 células/mL. A continuación, las larvas (5 por grupo) fueron infectadas con 10 µL de levaduras y se incubaron a 37 °C durante 3 horas. Pasado este tiempo, se realizó un pequeño corte con un bisturí en la parte ventral inferior de las larvas y la hemolinfa se recolectó en tubos eppendorf con 50 µL de PBS frío. Finalmente, se colocaron 10 µL de la hemolinfa sobre un portaobjetos y fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 3000B). Se contaron 100 hemocitos por muestra y se calculó el índice de fagocitosis como el porcentaje de hemocitos con levaduras (células con fluorescencia azul) en su interior con respecto al total de hemocitos.

3.7 Técnicas de citometría de flujo

3.7.1 Análisis de la viabilidad celular

Para comprobar la viabilidad de las levaduras se utilizó una tinción con yoduro de propidio, el cual solo penetra en células muertas porque tienen alterada la permeabilidad de la membrana. Primero se prepararon suspensiones de 500 µL a 10^7 células/mL y se añadió el yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 µg/mL. Las células muertas, que emiten fluorescencia roja por la captación del yoduro de propidio, se observaron con microscopio óptico de fluorescencia Leica DMI 3000B, y su proporción se estimó tras analizar las muestras mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD, Biosciences, Woburn, Massachusetts) midiendo la intensidad de fluorescencia en el canal FL-3. Como control positivo se utilizaron células de *C. neoformans* muertas por calor (65 °C durante 1 hora). Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados con el programa CellQuest (BD, Biosciences) y FlowJo (Tree star Inc, OR, USA) y representados en histogramas de fluorescencia en escala logarítmica.

3.7.2 Análisis de tamaño celular mediante citometría de flujo

Para observar las diferencias de tamaño mediante citometría de flujo, se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 10^6 células/mL. Doseos de estas suspensiones se pasaron a tubos específicos de citómetro. Las células fueron examinadas para el tamaño celular (FCS, *forward scatter*) y complejidad de las

células (SSC, *side scatter*) usando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD, Biosciences, Woburn, Massachusetts). Los datos fueron analizados con los programas descritos en el apartado anterior. Los datos fueron representados mediante gráfico de puntos (dot-plot) o histogramas con el programa FlowJo.

3.8 Técnicas de biología molecular

3.8.1 Obtención de ADN

Para la extracción de ADN genómico, se inoculó una colonia de *C. neoformans* en 10 mL de Sabouraud líquido y se incubó a 30 °C durante una noche. Al día siguiente, la suspensión de células se centrifugó a 3.000 g en una centrífuga Hermle z400k durante 3 minutos y el precipitado se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis (Triton X-100 2 %; SDS 1 %; NaCl 100 mM; Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Las células se transfirieron a un eppendorf de 2 mL y se añadieron 0,5 gramos de bolas de vidrio 425-600 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y 500 µL de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis). Para romper las células, los tubos se agitaron vigorosamente con un homogeneizador Fast-Prep-24 (M.P. Biomedicals). Para ello, se realizaron 2 ciclos de 45 segundos con intervalos de 1 minuto en hielo. A continuación, el extracto se centrifugó a 14.950 g durante 10 minutos en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se repitió la extracción con fenol-cloroformo alcohol isoamílico, añadiendo un volumen igual al del sobrenadante. Se centrifugó nuevamente a 14.950 g durante 15 minutos y se recogió de nuevo el sobrenadante. Se realizó una última extracción como se ha descrito anteriormente y la muestra se centrifugó 5 minutos a 14.950 g. Se retiró el sobrenadante y se mezcló con 0,6 volúmenes de isopropanol (Fisher Chemical). Se volvió a centrifugar a 14.950 g durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante por aspiración al vacío y el sedimento se lavó con etanol 70 %. Se realizó una última centrifugación a 14.950 g, se retiró el sobrenadante por aspiración, y tras dejar secar los tubos, el precipitado se disolvió en 25 µL de agua de PCR con RNasa 40 µg/mL (Roche) y se incubó 1 hora a 37 °C. La concentración y pureza del ADN genómico se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

3.8.2 Extracción y cuantificación de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el protocolo del Trizol (Ambion RNA by Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Tras obtener las células incubadas en las condiciones deseadas, las muestras se centrifugaron, y el Trizol se añadió inmediatamente a los sedimentos de células y se

mantuvieron en hielo para evitar la degradación del ARN. Para la rotura, las células se agitaron vigorosamente en un FastPrepR-24 (MPTM) alternando ciclos de rotura de 20 segundos y 1 minuto en hielo. Las células de tamaño pequeño se rompieron un total de 5 minutos y las células gigantes 10 minutos. La concentración de ARN fue cuantificada usando un Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo scientific). Para la preparación de muestras para secuenciación masiva, se realizó una purificación con el Kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.3 Iniciadores

Los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Iniciadores utilizados en este trabajo para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencias (5'-3')
18S-D	CCGTTGCTAGAGGTGAAATTCTTAG
18S-R	ATCTAATCGTTTTTGATCCCCTAAC
LAC-D	AGAAGGGAAGGAAGGTGATG
LAC-R	TATACCTCACAACCGCCAAT
URE-D	CGATTCTGGCACAAATGCTAT
URE-R	AGAGCCCTGTCAATGACT
PLB1-D	CTGCTTTGAGGACTACCTATGAGCGA
PLB1-R	CCTTGAGTTGTAACCACCATTGACGAA
CAP5-D	CCGCGTCTACATCTCATCT
CAP5-R	AGTGTGGGTCTGAAGGAATGT
CAP6-D	GATACCGTTCGTTGGGTCAA
CAP6-R	TGTAGTCTCAGAAGCGGAAGG
CAS35-D	AGGCTTGGATTTACGCTGAA
CAS35-R	ACCAAATTTGCTGCCCTTT
APP1-D	CTGTGCCAACTGTGTTGAAAT
APP1-R	TGCTGAGTAACGCGATTTGGA
IPC-D	TTGCCACACCTGGGAATC
IPC-R	TTTGCATCGGTGCCGAG
VAD1-D	ATTATCCCTACCCTTAACCGAAT
VAD1-R	ATGTTTGAAGTGCGAGTTCT

D, directo; R, reverso

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua de PCR (Roche) a una concentración de 100 µM.

3.8.4 PCR en tiempo real

Las muestras de ARN (1 µg/µL) se trataron con DNasa utilizando el Kit DNA-free™ DNA removal Kit (Thermo Fisher Scientific). Los ADNc (ADN complementario) fueron sintetizados a partir de 1 µg total de ARN usando el Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como controles, se

prepararon las mismas reacciones pero sin transcriptasa reversa. La PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizó en un volumen final de 10 µL que contenían 5 µL de SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (BioRad, Reino Unido), 0,5 µL de cada oligonucleótido (concentración final 1 µM, Tabla 3.5), 2 µL de cDNA y 2 µL de agua libre de RNasa y DNasa. Todas las RT-PCRs se realizaron en un LightCycler 480 (Roche). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 58 °C por 1 minuto. Por último se generaron curvas de fusión de los productos amplificados midiendo la fluorescencia del SYBR Green en una rampa de temperatura de 60 a 95 °C con 5 adquisiciones por grado. La temperatura de anillamiento de la PCR se estableció según la T_m de los oligonucleótidos. Para cuantificar la expresión de cada gen, se analizaron las curvas de amplificación mediante el método de la segunda derivada. A continuación, se calcularon los C_q de cada curva (por sus siglas en inglés de ciclos de cuantificación), y se calculó la variación de la expresión génica según se describe en (Pfaffl, 2004). En todos los experimentos se utilizó como gen de referencia el 18S de *C. neoformans*. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se aplicó la siguiente ecuación para calcular las diferencias relativas de expresión:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{diana}})^{\Delta Cq_{\text{diana}}(\text{control-tratamiento})} / (E_{\text{referencia}})^{\Delta Cq_{\text{referencia}}(\text{control-tratamiento})}$$

$E = 10^{1/S}$, S = pendiente de la recta

Ratio = Variación de la expresión

E_{diana} = Eficiencia del amplicón del gen diana

$E_{\text{referencia}}$ = Eficiencia del amplicón del gen de referencia.

3.8.5 Preparación de muestras para secuenciación masiva del ARN

Un total de 1 µg de ARN fue procesado con Ribo-Zero Magnetic Kit (Illumina, San Diego, CA) para eliminar el ARN ribosómico (ARNr). En este paso, las muestras se tratan con sondas que hibridan con el ARNr. A continuación, por medio de unas bolas magnéticas (Magnetic beads) que se unen a las sondas se retira el ARNr. Las muestras se purificaron usando el Kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Después, los ARN mensajeros fueron procesados para la obtención de las muestras usando ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation KIT (Epicenter). Brevemente, en primer lugar se realizó una fragmentación del ARN y alineamiento del cebador para la síntesis del ADNc. Después, se añadió el 3' terminal-Tag tras lo cual se realizó una nueva purificación usando el Kit AMPure XP System que funciona por bolitas magnéticas que eliminan los fragmentos del tamaño que no interesan. En el siguiente paso hay una amplificación de la muestra, se genera la segunda hebra del ADNc. En este mismo paso hay una adición de secuencias

adaptadoras, en lugar de cebadores reversos lleva estas secuencias que reconocen cada muestra (cada muestra lleva una secuencia adaptadora diferente). Por último, las muestras fueron purificadas usando el mismo Kit que en la purificación anterior. Las muestras fueron cuantificadas usando un QuantiFluor® RNA System y la calidad de las muestras se analizó en un Agilent 2100 Bioanalyzer. La secuenciación se llevó a cabo usando un Illumina NextSeq 500.

3.9 Técnicas de bioinformática

El análisis de los resultados de RNAseq se realizó en colaboración con el Dr. Joaquín Ariño (Universidad Autónoma de Barcelona). En primer lugar, se llevó a cabo el mapeo de los ficheros FastQ generados por el equipo con el software Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Estos son algunos de los parámetros relevantes (*local search, mode sensitive*). El mapeo se hizo contra la secuencia del genoma de referencia de *C. neoformans* var. *grubii* H99 obtenida de la base de datos de Broad Institute (https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiDownloads.html) correspondiente al ensamblado CNA3_3 (14 supercontigs más el genoma mitocondrial), cuya secuencia fue previamente indexada empleando el propio software Bowtie2.

Los ficheros SAM generados por Bowtie2 fueron analizados mediante el software SeqMonk v0.32.1. (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/seqmonk>). Dado que este software no dispone del genoma de *C. neoformans* en sus bases de datos, se construyó utilizando la opción que ofrece el software, un genoma específico a partir de las coordenadas correspondientes a los transcritos obtenidos de la base de datos del Broad Institute (transcripts.gtf). Se usó como parámetro para el mapeo el ARNm y se cuantificó como lecturas (*read counts*) correspondientes a la misma cadena que la "sonda", corrigiendo en función de la muestra con mayor número de secuencias mapeadas (*largest store*).

El producto del análisis se recuperó como *Annotated Probe Report*, anotando sobre las secuencias codificantes (opción *overlapping*) y se procesó en formato Excel. Los valores RPKM (*reads per kilobase million*) para los genes expresados más de 2 veces ($\log_2 > 1$), se han agrupado utilizando la distancia euclidiana y se definieron 2 grupos utilizando el algoritmo K-means del programa Cluster 3.0 (Janbon *et al.*, 2014). La representación de los grupos de expresión se realizó con el programa Java Treeview y la representación funcional de los genes con el programa FungiFun HKI.

3.10 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se han llevado a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California, USA). Previo a la comparación entre grupos, se estimó la normalidad de las muestras utilizando el test Kolmogorov-Smirnov. Cuando se obtuvo un valor $p < 0,05$, se asumió que las muestras no tenían una distribución normal, y se utilizaron tests no paramétricos. Para cuantificar diferencias entre grupos de muestras de distribución normal, se aplicaron las pruebas t-Student para comparación entre dos muestras y ANOVA para comparación de más de dos grupos. En caso el de muestras no normales, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparaciones por parejas y el Kruskal-Wallis para comparación de más de dos muestras. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Las diferencias de tamaño de las células fueron analizadas mediante la prueba t de Student. La correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo del cuerpo celular fue analizada mediante correlación de Pearson. Las curvas de supervivencia se ajustaron usando el test de Kaplan-Meier, y las diferencias en la supervivencia se evaluaron usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox).

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Para estudiar los cambios morfológicos durante la infección y su papel en la virulencia se han seguido varias líneas de investigación. Estos cambios ofrecen una ventaja selectiva al patógeno sobre el huésped y le permiten adaptarse a diferentes tipos de ambiente y de respuesta inmune. En la primera parte del trabajo, se ha estudiado el crecimiento capsular mediante la utilización de mutantes con defectos de inducción. A continuación, nos hemos centrado en estudiar en profundidad la formación de las células gigantes mediante la identificación de genes que cambian su expresión durante este proceso usando la secuenciación masiva del ARN, así como su formación en condiciones *in vitro* y la interacción con el huésped.

4.1 Estudio de la dinámica de la cápsula de *C. neoformans*

La síntesis de la cápsula sigue sin estar totalmente caracterizada en *C. neoformans*. Se sabe que esta estructura comienza a sintetizarse en las células hijas durante los primeros estadios de la gemación (Zaragoza *et al.*, 2006), aunque no se sabe si la acumulación de polisacárido sigue un patrón determinado. Además, la cápsula de *C. neoformans* no es una estructura estática, sino que puede cambiar de estructura y de tamaño según las condiciones ambientales. De esta manera, la cápsula tiene un tamaño pequeño en el ambiente (1-2 micras) y aumenta significativamente de tamaño, cuando el patógeno penetra en el huésped. En la primera parte de este trabajo, nos propusimos investigar la dinámica de la cápsula. Para el desarrollo de este objetivo, el trabajo se realizó en dos partes: inicialmente, se estudió como se sintetiza la cápsula, utilizando una cepa que solo sintetiza cápsula en galactosa. En segundo lugar, se llevaron a cabo varias estrategias para caracterizar el aumento del tamaño de la cápsula.

4.1.1 Síntesis de la cápsula

En primer lugar, quisimos estudiar la síntesis de la cápsula de *C. neoformans*. Para ello, se utilizó la cepa C538 (proporcionada por la Dra. Kwon-Chung), que carece del gen *CAP59*, a la que se le ha reintroducido el gen silvestre fusionado al promotor del gen *GAL7* (Chang *et al.*, 1995). Ya que este promotor solo se expresa en galactosa, esta cepa solo expresa el gen *CAP59* en esta fuente de carbono, por lo tanto tiene fenotipo acapsular en glucosa y encapsulada en galactosa. Para comprobar el fenotipo de la cepa C538, se inoculó en medio de glucosa y posteriormente se transfirió a medio de inducción de cápsula en el que se sustituyó glucosa por galactosa. Solo se observó la presencia de la cápsula tras la incubación de las células en galactosa (figura 4.1).

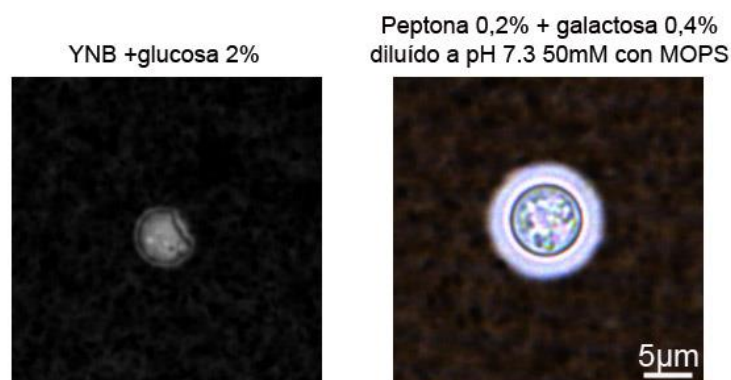


Figura 4.1. Tamaño de cápsula de la cepa C538 en diferentes medios visualizado mediante suspensión de las células en tinta china. El mutante C538 creció en YNB + glucosa 2 % (panel izquierdo), y después se transfirieron a Peptona 0,2 % + galactosa 0,4 % diluido con 50 mM de MOPS a pH 7.3 durante 24 horas (panel derecho).

Para observar cómo se sintetiza la cápsula, se utilizó un anticuerpo primario de ratón 2H1 (IgG1) que se une al GXM de la cápsula con el mutante C538 transfiriendo las células a medio de inducción de cápsula a 0, 1, 2 y 3 horas.

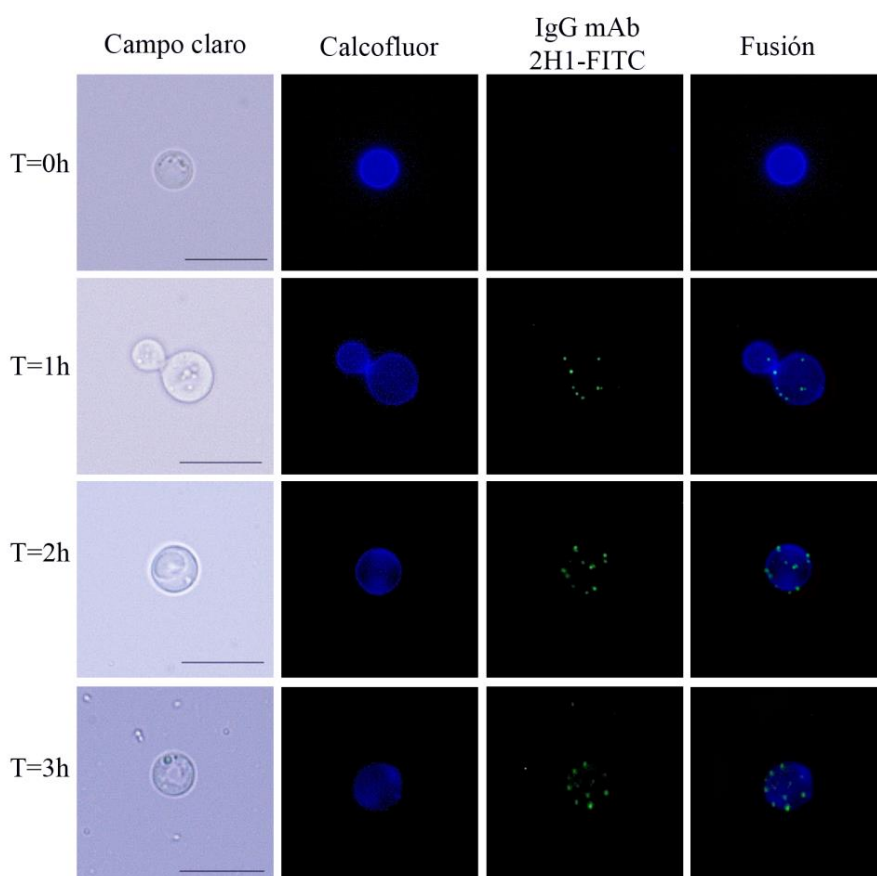


Figura 4.2. Dinámica de síntesis de la cápsula del mutante C538 (*cap59/ GAL7::CAP59*). Las células crecieron en YNB glucosa (T0) y se transfirieron a peptona 0,2% + galactosa 0,4%, pH 7,3, 50 mM MOPS. A diferentes tiempos (1, 2, 3 h), se visualizó la pared celular con calcofluor (fluorescencia azul), y la cápsula con el anticuerpo 2H1 y un anticuerpo secundario marcado con FITC. Además, se muestran también las imágenes en campo claro y la fusión de las dos fluorescencias. La barra de escala en cada fila corresponde a 10 µm.

En este medio de inducción se sustituyó la glucosa por la galactosa (Peptona 0,2 % + galactosa 0,4 %, pH 7,3, 50 mM MOPS). Como se muestra en las imágenes, se observó un crecimiento progresivo de la cápsula en forma de puntos que se distribuyeron alrededor de toda la célula de manera homogénea y no polarizada, alrededor del cuerpo celular (figura 4.2).

4.1.2 Crecimiento de la cápsula

El crecimiento de la cápsula es un proceso muy característico de *C. neoformans* y necesario para causar infección. El incremento de tamaño de la cápsula ocurre por adición de nuevo polisacárido y se cree que es un proceso muy costoso energéticamente, aunque este aspecto no ha sido estudiado en profundidad. Por este motivo, quisimos estudiar por un lado el papel de la actividad mitocondrial durante el crecimiento capsular mediante el uso de inhibidores de la fosforilación oxidativa. Además, también nos propusimos analizar el efecto de este cambio morfológico en la virulencia y su papel en la interacción con el huésped. Para este objetivo, se utilizó el mutante *gat201* que tiene un defecto en la inducción de cápsula (Liu *et al.*, 2008).

4.1.1.1 Evaluación de la inhibición de la cadena respiratoria en el crecimiento capsular

En la siguiente parte del trabajo, estudiamos en qué medida la inducción de la cápsula de *C. neoformans* depende de la actividad mitocondrial de la célula. Para ello, utilizamos diferentes inhibidores de la fosforilación oxidativa y evaluamos su efecto en la inducción de la cápsula. Estos inhibidores mitocondriales bloquean diferentes rutas y complejos de la cadena respiratoria. La rotenona bloquea el complejo I (ubiquinona óxido reductasa), la antimicina A, el complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa), el ácido salicilhidroxámico (SHAM) bloquea la ruta alternativa AOX, la azida de sodio y el cianuro de potasio (KCN), el complejo IV (citocromo c oxidasa terminal) y la oligomicina bloquea el complejo V (Alonso-Monge *et al.*, 2009; Herweijer *et al.*, 1985).

4.1.1.1.1 Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre el crecimiento y la viabilidad celular

En primer lugar, se realizaron curvas de crecimiento con la cepa silvestre H99 en medio líquido Sabouraud en presencia de los inhibidores mitocondriales para determinar la concentración mínima inhibitoria. Como se muestra en la figura 4.3, todos los inhibidores causaron una disminución del crecimiento en comparación con el control. Esta inhibición fue dependiente de la concentración de inhibidor. A continuación, quisimos comprobar si los inhibidores tenían un efecto fungicida o fungistático sobre

Resultados

C. neoformans. Se tomaron 10 μ L de los pocillos de las placas de microdilución en las que se realizaron las curvas de crecimiento, y se colocaron en placas de Sabouraud sólido durante 24 horas a 30 °C.

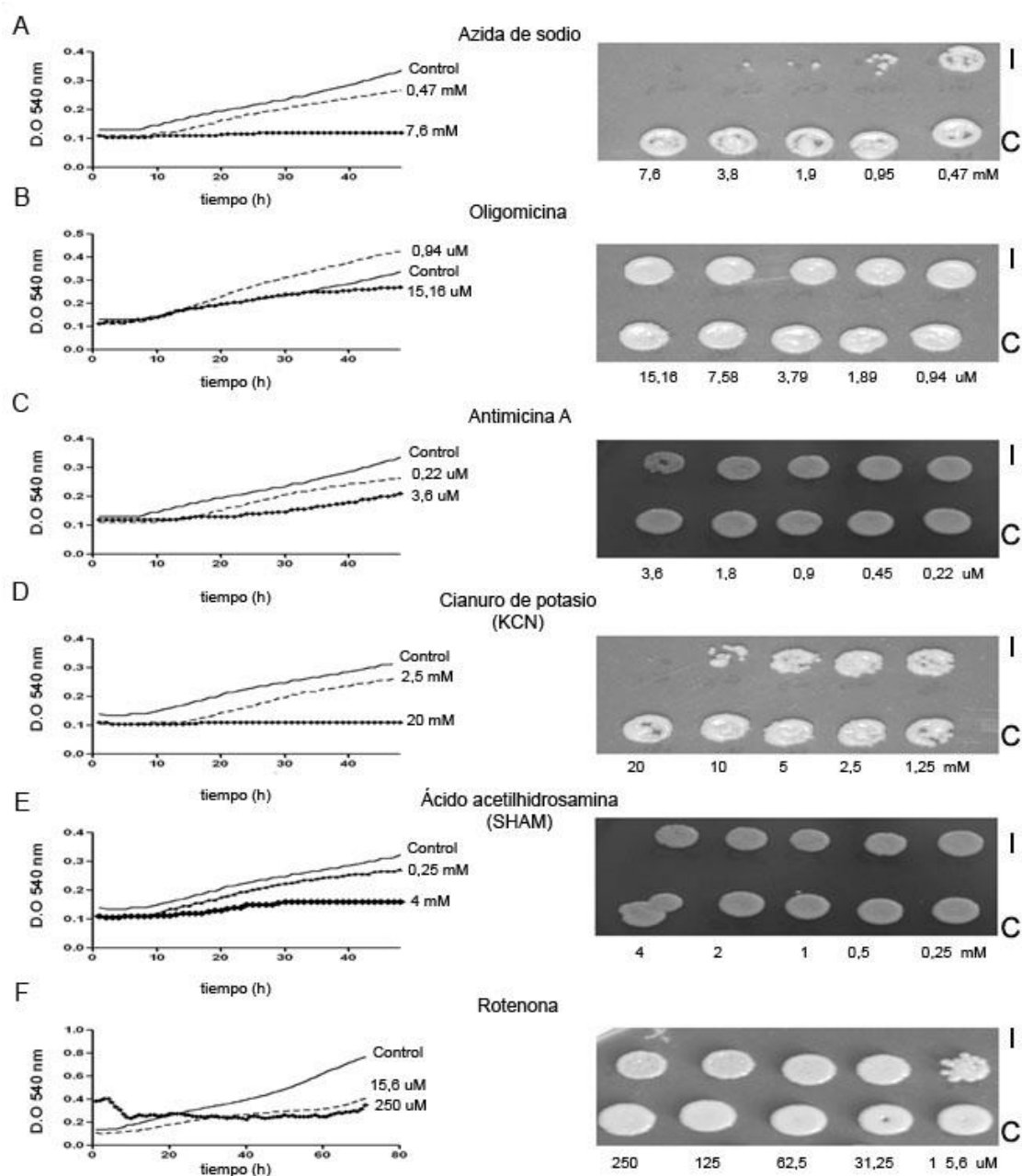


Figura 4.3. Efecto de inhibidores mitocondriales sobre *C. neoformans*. Células de *C. neoformans* se cultivaron en Sabouraud líquido en presencia de diferentes inhibidores (azida de sodio (A), oligomicina (B), antimicina A (C), cianuro de potasio (D), ácido salicilhidroxámico (E) y rotenona (F)) en placas de 96 pocillos y se realizaron curvas de crecimiento 48 ó 72 horas a 30 °C como se indica en Material y métodos. Tras finalizar la curva, se tomaron 10 microlitros de determinados pocillos control (C) o con inhibidor (I) y se coloraron en placas de Sabouraud, las cuales se incubaron a 30 °C durante 48 h. Tras ese tiempo, se tomaron fotografías (paneles de la derecha).

Observamos que la oligomicina, antimicina A, SHAM y la rotenona inhibían el crecimiento pero no mataban a las células. La oligomicina no ha sido incluida en el resto

de experimentos realizados ya que no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento. Por otra parte, no observamos crecimiento en las placas incubadas en presencia de concentraciones medias-altas de azida de sodio (7,6 y 3,8 mM), ni a las concentraciones más altas de KCN (20 y 10 mM), por lo que concluimos que estos inhibidores fueron fungicidas y tampoco fueron incluidos en el estudio. Todos los experimentos se realizaron en paralelo con el solvente correspondiente (Etanol, DMSO o H₂O) y en ningún caso se produjo inhibición del crecimiento celular a las concentraciones utilizadas (resultados no mostrados).

4.1.1.1.2 Efecto de inhibidores específicos de la cadena respiratoria de electrones en la inducción de la cápsula de *C. neoformans*

A continuación, evaluamos el papel de la actividad mitocondrial durante el crecimiento de la cápsula.

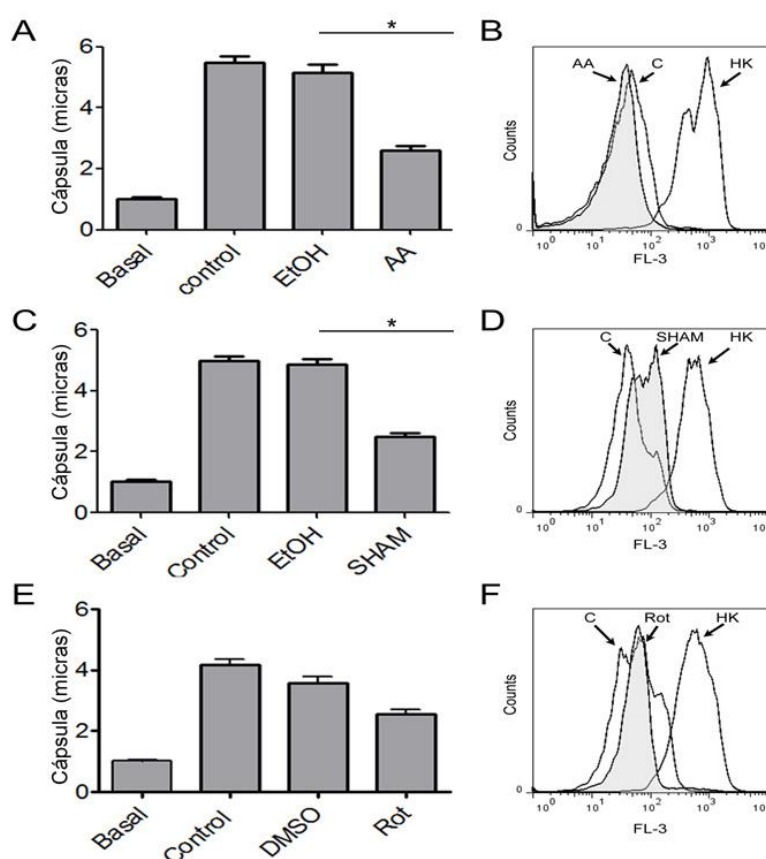


Figura 4.4. Efecto de inhibidores mitocondriales durante la inducción de la cápsula. Células de la cepa H99 fueron incubadas en medio de inducción capsular en presencia de antimicina A (A y B), SHAM (C y D) y rotenona (E y F) durante 18 h. En cada caso, se llevaron como control muestras incubadas con el solvente correspondiente (DMSO o EtOH). (A, C y E). Tamaño de la cápsula de las células tras suspender las células en tinta china. En todos los casos, se incluye el tamaño de las células a tiempo cero (Basal). Los asteriscos indican diferencias significativas. (B, D y F). Medida de la viabilidad de las células tras la incubación con los inhibidores. Las células se incubaron con yoduro de propidio y se evaluó la mortalidad mediante citometría de flujo. Como control, se incluyeron las células muertas por calor (HK).

Las células se inocularon en Sabouraud líquido a 30° C durante una noche y posteriormente se transfirieron a medio inductor de la cápsula en presencia de las concentraciones más altas de los inhibidores antimicina A, SHAM y rotenona. Observamos que la inducción de la cápsula se ve afectada en presencia de estos inhibidores en comparación con el control (medio inductor sin inhibidores, figura 4.4).

Estos resultados indican que el proceso de inducción de cápsula requiere la actividad mitocondrial de la célula al completo. Además, analizamos la viabilidad celular por citometría de flujo durante la inducción de la cápsula para descartar que la falta de crecimiento de la cápsula fuera debida a la muerte de las células por los inhibidores en estas condiciones. Como se observa en la figura 4.4, no observamos muerte celular con ninguno de los inhibidores estudiados.

4.1.1.1.3 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial durante la inducción de la cápsula

La generación de ATP en la mitocondria es el producto del transporte de electrones y del gradiente electroquímico generado por la salida de protones en los complejos I, III y IV al espacio intermembrana, lo que a su vez produce diferencia en el potencial de membrana.

De esta manera, se induce la internalización de los protones a favor de gradiente a través del complejo V (ATP sintasa), el cual utiliza la energía de este gradiente para sintetizar ATP. Por lo tanto, evaluamos el potencial de membrana mitocondrial durante la inducción de la cápsula de *C. neoformans*. Para ello, utilizamos la sonda fluorescente rodamina 123, cuya acumulación en la mitocondria depende del potencial de membrana. Observamos que las células acumularon mayor cantidad de rodamina 123 cuando se incubaron en medio inductor que en medio de crecimiento rico Sabouraud a medida que fue aumentando el tamaño celular (figura 4.5).

Este resultado sugiere que durante la inducción de la cápsula se produjo un aumento en el potencial de membrana mitocondrial, probablemente debido a un aumento de la actividad mitocondrial.

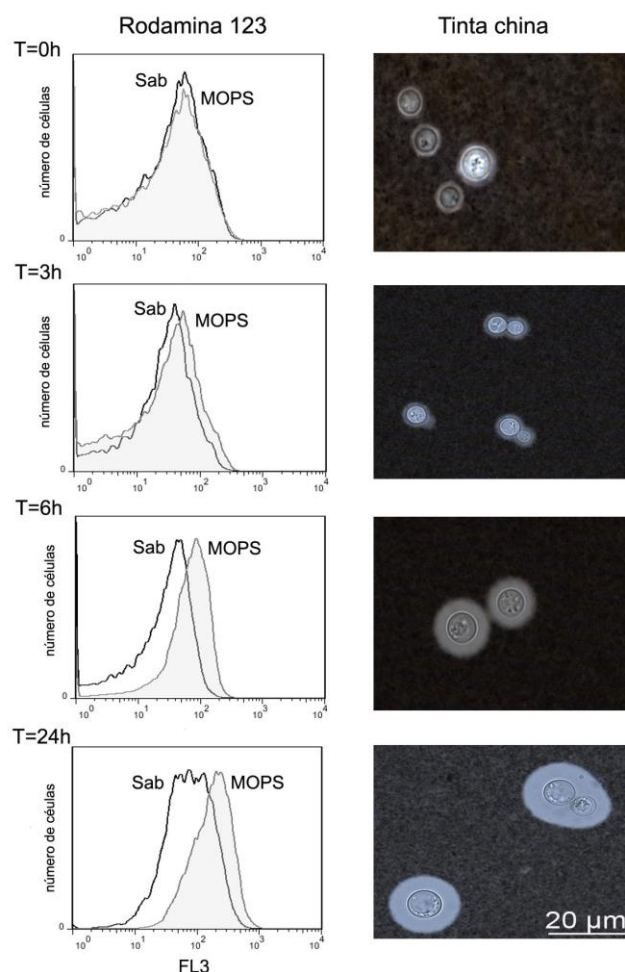


Figura 4.5. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial durante el crecimiento capsular. Células de la cepa H99 se incubaron en medio de inducción de cápsula o en Sabouraud, y a diferentes tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) se añadió Rodamina 123. La captación de esta sonda se midió mediante citometría de flujo (panel izquierdo). Las células en Sabouraud (Sab) se representan con el histograma en línea negra, mientras que las células en medio inductor de cápsula (MOPS) están representadas en histogramas en gris. En las fotografías de la derecha se muestran células representativas de cada tiempo en medio inductor de la cápsula.

4.1.2.1 Características morfológicas de la cepa mutante *gat201*

Los mecanismos y elementos que regulan el crecimiento de la cápsula no son conocidos. Sin embargo, se sabe que el gen *GAT201* no se requiere para niveles basales de cápsula pero si es necesario para la inducción de la cápsula (Liu *et al.*, 2008).

Por este motivo, investigamos si este mutante estaba afectado en fenotipos relacionados con la virulencia. En primer lugar, comprobamos que la cepa *gat201* no era capaz de aumentar el tamaño capsular. Como se observa en la figura 4.6., el mutante *gat201* no indujo el crecimiento de la cápsula en el medio de inducción en comparación con la cepa silvestre.

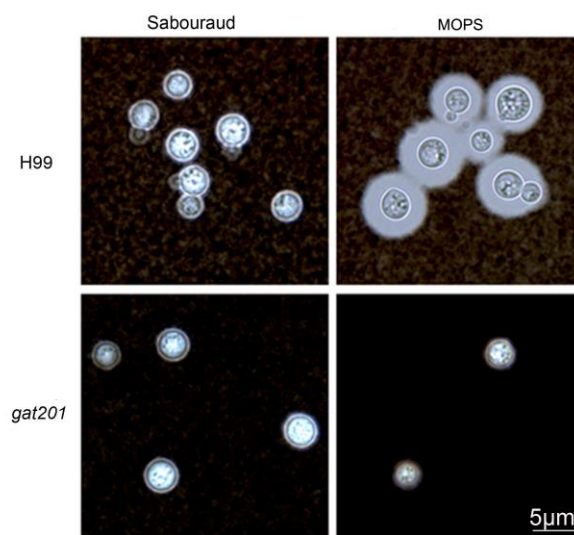


Figura 4.6. Inducción del crecimiento capsular del mutante *gat201*. Tinción con tinta china de células de la cepa H99 (imágenes de la parte superior) y del mutante *gat201* (imágenes de la parte inferior) en medio Sabouraud líquido y medio inductor de la cápsula (10 % Sabouraud diluido con MOPS a pH 7.3, (MOPS)).

Cuando cuantificamos el tamaño de las células y de la cápsula, observamos que la cepa silvestre aumentó tanto la cápsula como el cuerpo celular en el medio de inducción. Sin embargo, el mutante *gat201* no indujo el crecimiento de ninguna de estas estructuras (figura 4.7).

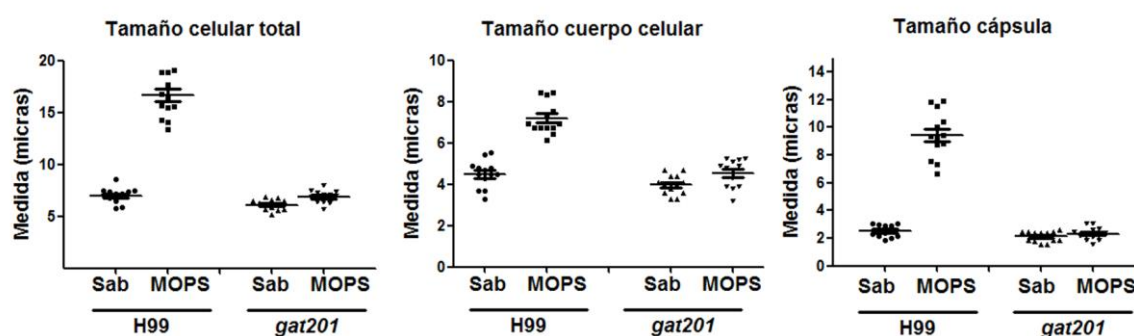


Figura 4.7. Distribución del tamaño celular total, tamaño del cuerpo celular y tamaño de la cápsula. Células de la cepa H99 y del mutante *gat201* en medio Sabouraud (Sab) y medio inductor de la cápsula (MOPS) a 37 °C durante una noche. Las líneas representan la media y el error estándar.

4.1.2.2 Estudio de la virulencia del mutante *gat201* en *Galleria mellonella*

A continuación, estudiamos si el defecto de crecimiento capsular del mutante *gat201* alteraba su virulencia. Utilizamos como modelo el lepidóptero *G. mellonella*, que

ha sido utilizado en otros estudios de virulencia de *Cryptococcus* (Mylonakis *et al.*, 2005; Garcia-Rodas *et al.*, 2011; Trevijano-Contador and Zaragoza, 2014). Este modelo proporciona ciertas ventajas por su fácil manejo y bajo coste. Además, con su utilización se evitan los problemas éticos asociados al uso de animales mamíferos en la investigación.

En primer lugar, se infectaron grupos de 20 larvas con un inóculo de 10^6 células/larva de ambas cepas y se incubaron a 30 y 37 °C durante 3 días. Se analizaron los tamaños de las levaduras recuperadas de las larvas a este tiempo post-infección y se comparó con el tamaño de células cultivadas *in vitro*. El mutante *gat201* no aumentó el tamaño de la cápsula tampoco durante la infección del huésped, mientras que la cepa silvestre lo hizo de forma significativa ($p < 0,05$) (figura 4.8).

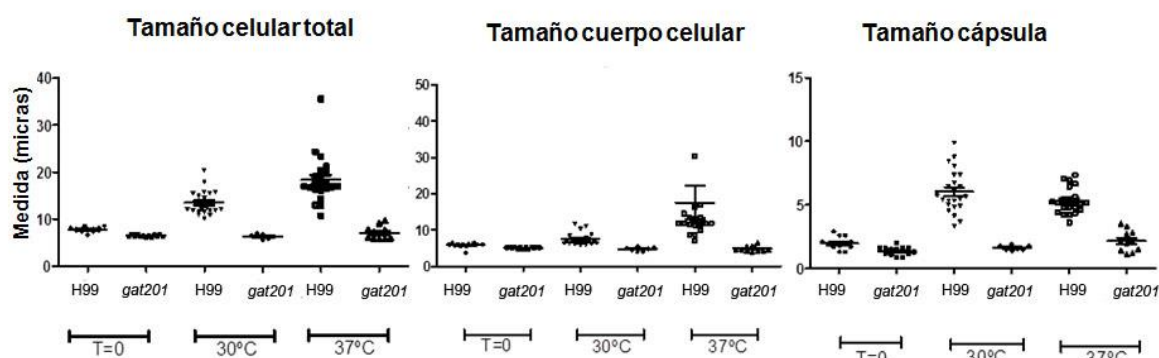


Figura 4.8. Tamaño de las células del mutante *gat201* en *G. mellonella*. Distribución del tamaño total, tamaño del cuerpo celular y tamaño de la cápsula de células de la cepa H99 y el mutante *gat201* recuperadas de *G. mellonella* a diferentes temperaturas (30 y 37 °C) después de 3 días de infección. Las líneas representan la media y el error estándar.

4.1.2.3 Efecto del crecimiento de la cápsula en la virulencia en el modelo de *G. mellonella*

A continuación, quisimos investigar si el mutante *gat201* tenía afectada su virulencia en *G. mellonella*. Previamente, quisimos saber cómo crecía el mutante *gat201* en comparación con la cepa silvestre. Realizamos curvas de crecimiento en Sabouraud líquido a 30 y 37 °C durante 72 horas. Como se observa en la figura 4.9 (A y B), tanto la cepa silvestre como el mutante crecieron igual a ambas temperaturas.

Posteriormente, investigamos si el mutante *gat201* tenía alterada la virulencia en el modelo de *G. mellonella*. Para ello, se inoculaban larvas con una dosis de 10^6 células/larva con la cepa silvestre y el mutante y se incubaron a 30 y 37 °C. *Cryptococcus*

Resultados

neoformans resultó más virulento, cuando las larvas infectadas se incubaron a 37 °C en comparación con la larvas mantenidas a 30 °C, tal y como ya se había descrito (Mylonakis *et al.*, 2005). Sin embargo, a ambas temperaturas, las larvas infectadas con el mutante *gat201* mostraron una supervivencia mayor que las larvas infectadas con la cepa silvestre ($p < 0,0001$) (figura 4.9 C y D).

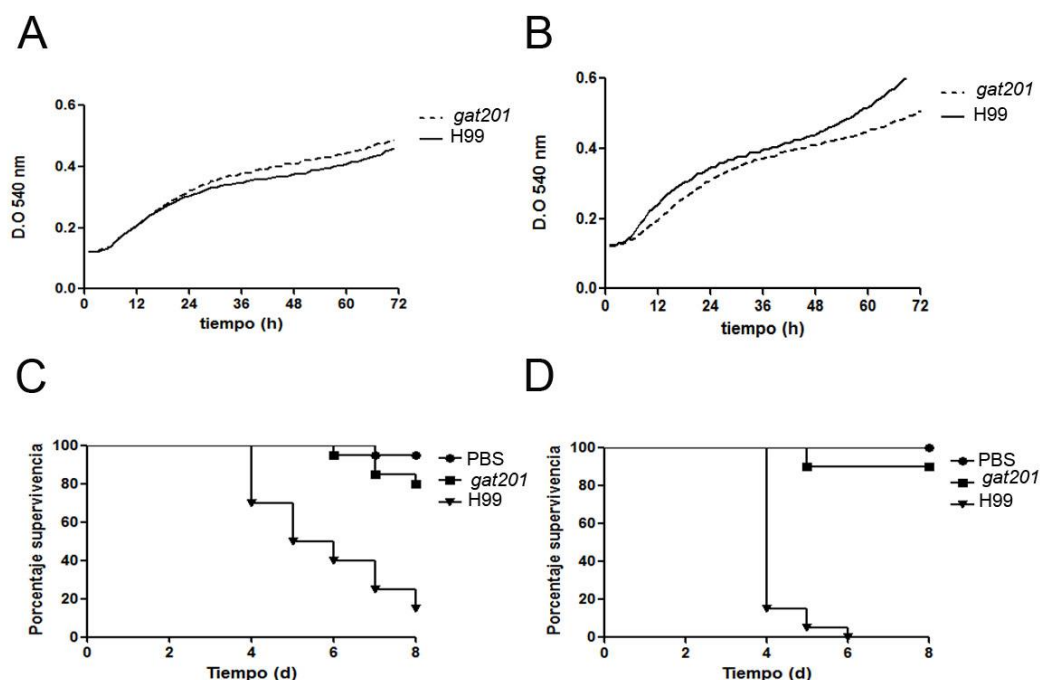


Figura 4.9. Virulencia del mutante *gat201* a diferentes temperaturas. (A y B) Curvas de crecimiento a 30 (A) y 37 °C (B) de la cepa H99 (línea negra) y el mutante *gat201* (línea de puntos) durante 72h. (C y D) Curvas de supervivencia de *G. mellonella* inoculadas con 10^6 células/larva de la cepa H99 (▼) y el mutante *gat201* (■). Tras la infección, las larvas fueron incubadas a 30 (C) o 37 °C (D) y la supervivencia fue monitorizada diariamente. Un grupo control de larvas fue inoculado con PBS (●) como control a ambas temperaturas.

4.1.2.4 Efecto de la inducción de la cápsula en la fagocitosis durante la infección

Ya que el mutante *gat201* tiene un defecto en la inducción de la cápsula, quisimos investigar la interacción de este mutante con células fagocíticas de *G. mellonella*. Para este propósito, se infectaron grupos de larvas con el mutante *gat201* y la cepa silvestre H99 como se ha descrito en apartados anteriores, pero en este caso las levaduras fueron teñidas con calcofluor (ver Material y métodos). Al cabo de 3 horas de infección, se extrajo la hemolinfa de 3-4 larvas por grupo y se enumeró la cantidad de hemocitos que tenían células de *C. neoformans* internalizadas. La fagocitosis aumentó significativamente en la cepa mutante en comparación con la fagocitosis observada en la cepa H99

($p < 0,05$). El porcentaje de fagocitosis de *gat201* fue alrededor del 60 % mientras que en la cepa silvestre en torno a 25-30 % (figura 4.10).

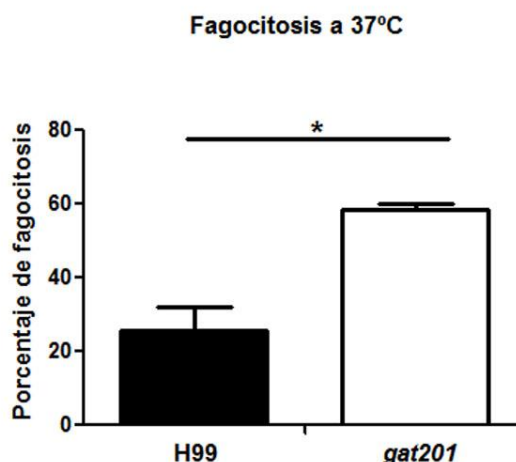


Figura 4.10. Fagocitosis *in vivo* de *C. neoformans* por hemocitos de *G. mellonella*. Grupos de 5-7 larvas fueron infectadas con 10^6 células de la cepa H99 o *gat201*, y tras 3 horas de incubación a 37 °C se evaluó el porcentaje de fagocitosis *in vivo*. El asterisco indica un $p < 0,05$.

4.1.2.5 Capacidad de replicación del mutante *gat201* en el interior de los macrófagos

Cryptococcus neoformans es un patógeno intracelular facultativo, por lo que es capaz de sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos, así como salir al espacio extracelular e infectar a otras células (Tucker and Casadevall, 2002; Alvarez and Casadevall, 2006; Alvarez and Casadevall, 2007). En estos procesos, la cápsula juega un papel fundamental ya que le confiere resistencia a factores de estrés. Por ello, evaluamos la capacidad de la cepa mutante *gat201* de replicarse en presencia de macrófagos de ratón en comparación con la cepa silvestre. Para ello, se extrajeron macrófagos primarios obtenidos de lavados peritoneales de ratones C57BL/6J (ver Material y métodos). Los macrófagos se incubaron con levaduras opsonizadas con el anticuerpo 18B7 durante 24 horas y se cuantificó el número de UFCs en el medio, así como las intracelulares tras lisar los macrófagos. En la figura 4.11 se puede observar que tras 24 horas la cantidad de levaduras fuera del macrófago es mayor en la cepa silvestre en comparación con el mutante ($p < 0,05$). Estos datos indican que la cepa silvestre se fagocita menos gracias a la cápsula o que es capaz de salir de los macrófagos con más facilidad. En el interior de los macrófagos, la cantidad de células fue mayor en el mutante *gat201* aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

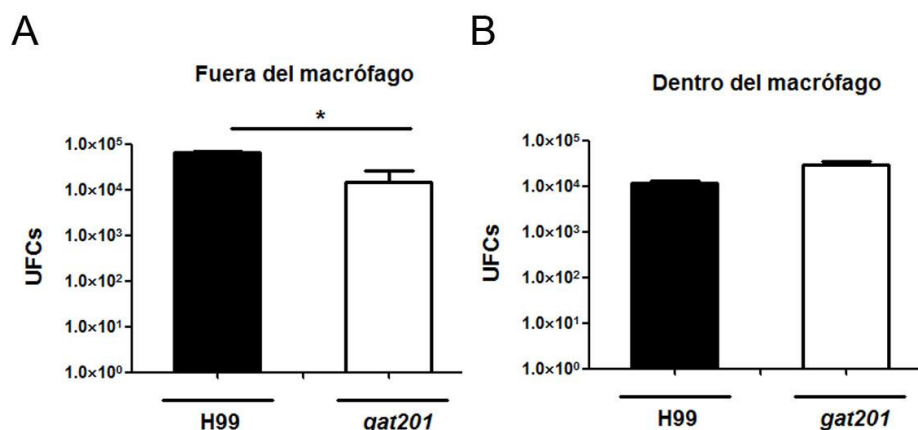


Figura 4.11. Replicación del mutante *gat201* en macrófagos murinos. Células de las cepas H99 y *gat201* fueron expuestas a macrófagos peritoneales primarios de ratón en presencia del anticuerpo 18B7 en proporción 1:1. Se cuantificó la cantidad de levaduras que al cabo de 24 horas de fagocitosis había tanto fuera (A) como dentro (B) de los macrófagos.

4.2 Estudio de la formación de células gigantes de *C. neoformans* *in vitro*

En una segunda parte del trabajo, nos propusimos estudiar la formación de células gigantes. Una de las principales limitaciones que tiene el estudio de este tipo de células es que solo se obtienen de modelos *in vivo*, habiendo sido descritas *in vitro* de manera muy ocasional (Chrisman *et al.*, 2011). Por ello, en el desarrollo de esta tesis, hemos intentado buscar condiciones que pudieran reproducir la formación de células gigantes *in vitro*. *Cryptococcus neoformans* induce un aumento significativo de la cápsula en medios limitantes en nutrientes a pH neutro (10 % de Sabouraud tamponado a pH 7.3 con MOPS 50 mM). Basándonos en este medio, investigamos si la adición de algún componente fisiológico, como el suero, inducía el crecimiento no solo de la cápsula, sino también del cuerpo celular.

En los primeros experimentos, observamos que la sustitución de parte del Sabouraud por suero causó un aumento significativo en el tamaño de las células. Además, observamos de manera fortuita que concentraciones subinhibitorias del inhibidor mitocondrial azida sódica, mejoraban la eficacia de este medio para inducir células gigantes (figura 4.12). El aumento de tamaño fue progresivo según las células se transfirieron a medio fresco cada día, por lo que en estas condiciones fuimos capaces de obtener células de alrededor de 30 micras de diámetro (figura 4.13).

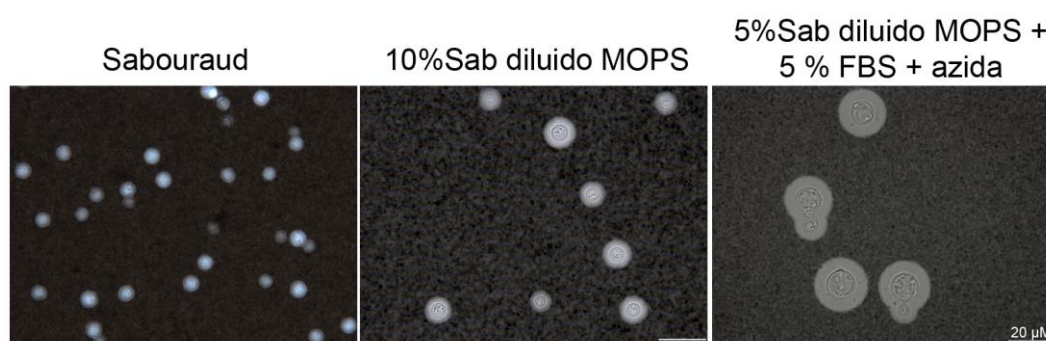


Figura 4.12. Tamaño celular y capsular de *C. neoformans* en diferentes medios. Las células de la cepa H99 fueron inoculadas en Sabouraud (panel izquierdo), en medio inductor de la cápsula (10 % Sabouraud con MOPS a pH 7.3, panel central) y en 5 % de Sabouraud con MOPS + 5 % de FBS + azida de sodio (panel derecho). Tras 3 días, su tamaño celular y capsular se visualizó mediante suspensión de las células en tinta china.

Las células gigantes se han definido como aquellas células con un cuerpo celular mayor a 15 micras (Zaragoza and Nielsen, 2013). Como se observa en la figura 4.13, al cabo de los 3 días de incubación, observamos un incremento significativo del tamaño celular total en el medio inductor parcialmente diluido con FBS y el inhibidor mitocondrial en comparación con el medio inductor de la cápsula ($p < 0.05$). La media de tamaño celular fue de unas 15 micras, pero llegaron a observarse células de hasta 25 micras.

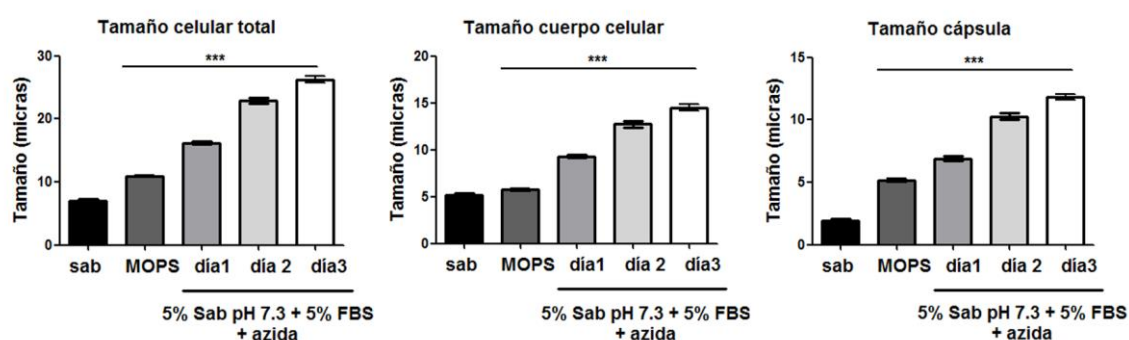


Figura 4.13. Tamaño total, tamaño del cuerpo celular y tamaño de la cápsula de *C. neoformans* tras 3 días de incubación en Sabouraud (Sab), en medio inductor de la cápsula (MOPS) y en medio inductor de la cápsula diluido con 5 % de FBS + azida a 37 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de Sabouraud ($p < 0.05$).

4.2.1 Caracterización de los factores que influyen en la formación de células gigantes *in vitro*

Como se ha mostrado en el apartado anterior, el suero es un factor determinante para la formación de células gigantes, por lo que quisimos caracterizar mejor el papel que juega este elemento en este cambio morfológico. Como se observa en la figura 4.14A, el suero es necesario para la formación de células gigantes, ya que en su ausencia el

Resultados

incremento del tamaño celular es significativamente menor ($p < 0,05$). Sin embargo, el FBS no fue suficiente para producir este cambio morfológico, ya que la incubación de las células de *C. neoformans* en 100 % de FBS no resultó en incremento del tamaño celular (resultado no mostrado).

A continuación, analizamos cuál era la concentración de suero óptima para inducir la formación de células gigantes. En la figura 4.14A se observa que concentraciones de suero superiores al 10% inhibieron este cambio morfológico. En paralelo, se realizó un experimento en el que las células de *C. neoformans* crecieron en medio rico Sabouraud y en este mismo medio suplementado con 5% de FBS. En este medio, el suero no indujo la formación de células gigantes, indicando que este cambio morfológico ocurre en condiciones limitantes de nutrientes (figura 4.14B).

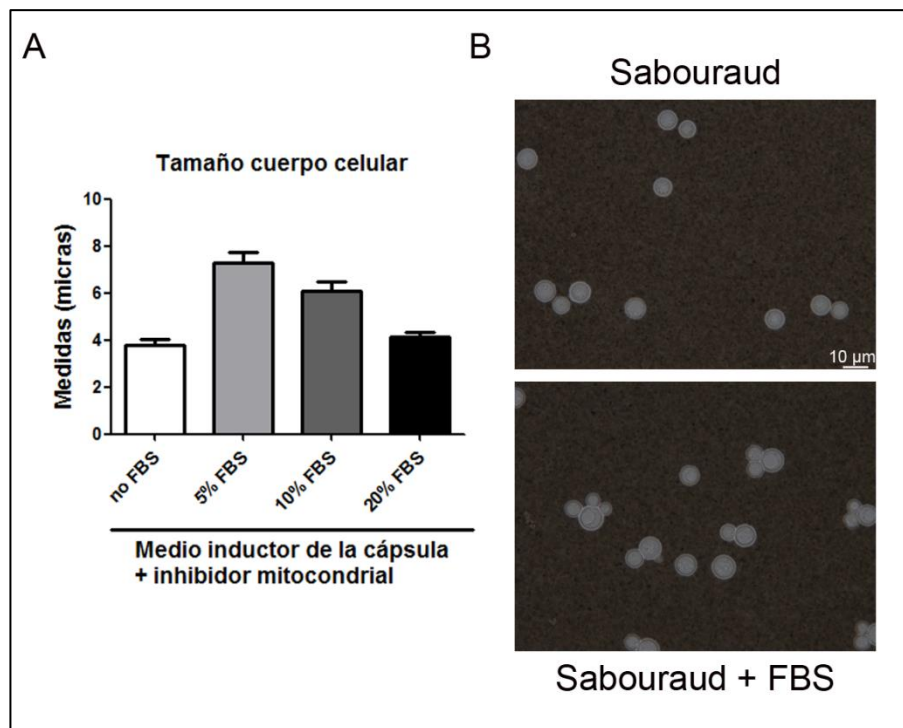


Figura 4.14. Distribución del tamaño del cuerpo celular de la cepa H99 incubadas en medio inductor de la cápsula + azida de sodio suplementado con diferentes concentraciones de FBS (A). Suspensión en tinta china de células de *C. neoformans* H99 inoculadas en Sabouraud (B, panel superior) y en Sabouraud suplementado con 5 % de FBS (B, panel inferior).

Cryptococcus son levaduras respiratorias, por lo que su metabolismo es dependiente de oxígeno y de actividad mitocondrial. Curiosamente, concentraciones subinhibitorias de azida sódica (que inhibe el complejo IV de la cadena transportadora de electrones y por lo tanto de la síntesis de ATP (Herweijer *et al.*, 1985)), favorecen el crecimiento celular (figura 4.15 A y B), sugiriendo que la inhibición parcial de la cadena respiratoria causa un estrés que induce la formación de células gigantes.

A continuación, quisimos saber si la limitación de oxígeno afectaba a este cambio morfológico. La agitación de los cultivos en medio inductor de células gigantes (MOPS + 5% FBS + inhibidor mitocondrial) a una velocidad de 150 r.p.m. resultó en una menor proporción de células gigantes (figura 4.15 C), comparado con cultivos paralelos incubados sin agitación. Estos datos confirman que una menor oxigenación favorece la formación de las células gigantes en condiciones *in vitro*.

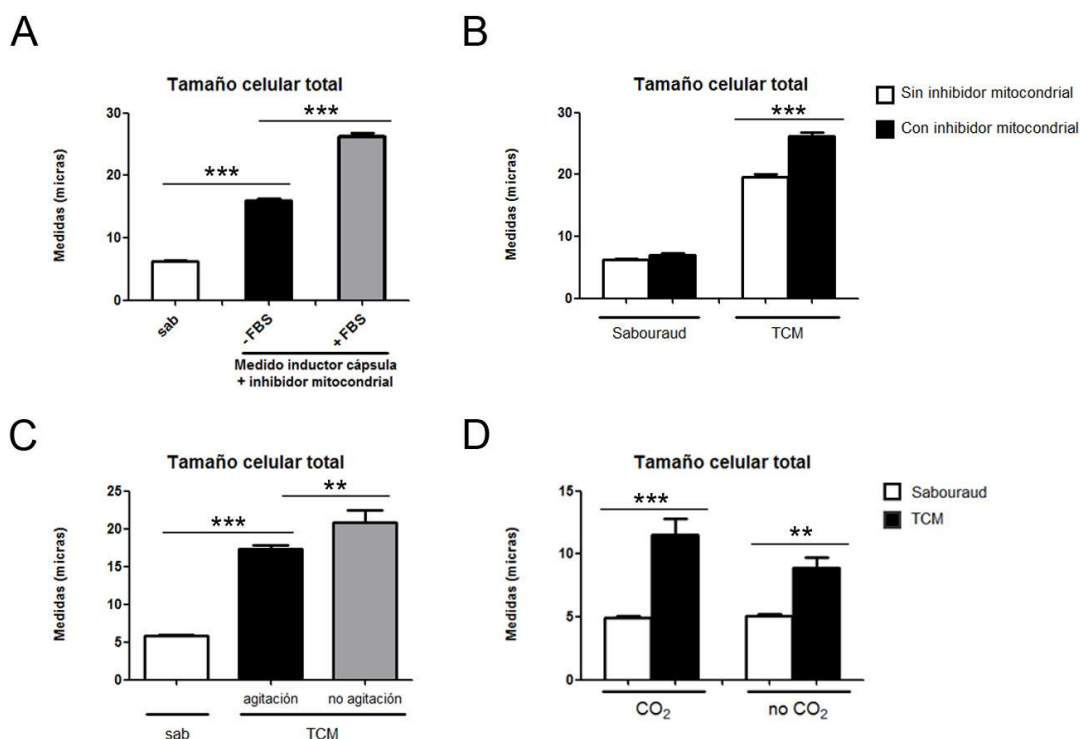


Figura 4.15. Efecto de diferentes factores sobre el crecimiento celular de *C. neoformans*. Células de la cepa H99 crecieron en Sabouraud durante una noche y se transfirieron a diferentes medios para evaluar el efecto de varios factores sobre la formación de células gigantes tras incubación a 37 °C. (A) Las células se incubaron en Sabouraud o en medio inductor de cápsula (10% Sab, pH 7,3) suplementado con azida sódica 15 μ M, y en presencia o ausencia de 5% de suero (FBS). (B) Influencia de la azida sódica (barras negras, 15 μ M) sobre el tamaño celular en Sabouraud o medio TCM. Como control, se inocularon los mismos medios sin azida sódica (barras blancas). (C) Las levaduras se incubaron a 37 °C en matraces con Sabouraud o en medio TCM. Un matraz en TCM se mantuvo en agitación, mientras que otro se mantuvo estático. (D) Efecto del CO₂ sobre el crecimiento celular. Las células se inocularon en dos matraces Sabouraud o de TCM por duplicado. Un matraz en cada medio se incubó en presencia de CO₂, mientras que el otro se mantuvo con una concentración de CO₂ atmosférica. En ambos casos se incubó a 37 °C sin agitación.

El crecimiento capsular está inducido por altas concentraciones de CO₂, lo que asemeja las condiciones durante la infección en el pulmón, donde la concentración de CO₂ es de un 5 %, en comparación con un 0,033 % en el ambiente (Granger *et al.*, 1985). Por este motivo, evaluamos el papel que juega el CO₂ en la formación de células gigantes *in vitro*. Para este propósito, se incubaron cultivos de la cepa silvestre H99 en los diferentes medios en un ambiente enriquecido con CO₂. En este experimento, observamos que la inducción de las células gigantes se veía favorecida en una atmósfera

Resultados

con un 5 % de CO₂ en comparación con aquellas células incubadas a 37 °C con concentraciones ambientales de CO₂ (figura 4.15 D).

Estos resultados nos llevaron a definir el medio que contiene 5 % de Sabouraud tamponado a pH 7.3 con 50 mM de MOPS, suplementado con 5 % de FBS y azida de sodio a 15 µM, como medio inductor de células gigantes (TCM). Además, los experimentos se realizaron a 37 °C sin agitación y con una concentración de CO₂ del 5 %.

4.2.2 Curvas de crecimiento en medio inductor de células gigantes

La azida de sodio es un inhibidor de la cadena transportadora de electrones y uno de los componentes del medio inductor de células gigantes. Por ello, quisimos evaluar el crecimiento de las levaduras en las condiciones óptimas para la producción de este tipo de células. Se realizaron curvas de crecimiento con la cepa silvestre durante 24 horas a 30 °C (T^a normal de crecimiento de *Cryptococcus*) y 37 °C (T^a óptima de inducción de células gigantes). Las curvas de crecimiento se realizaron en medio Sabouraud (control de crecimiento), Sabouraud + azida (control) y medio TCM (medio inductor de células gigantes). Como se observa en la figura 4.16, el inhibidor causó una disminución del crecimiento en comparación con el Sabouraud. Por otra parte, el crecimiento de las levaduras en medio TCM se vio afectado en comparación con el Sabouraud + azida.

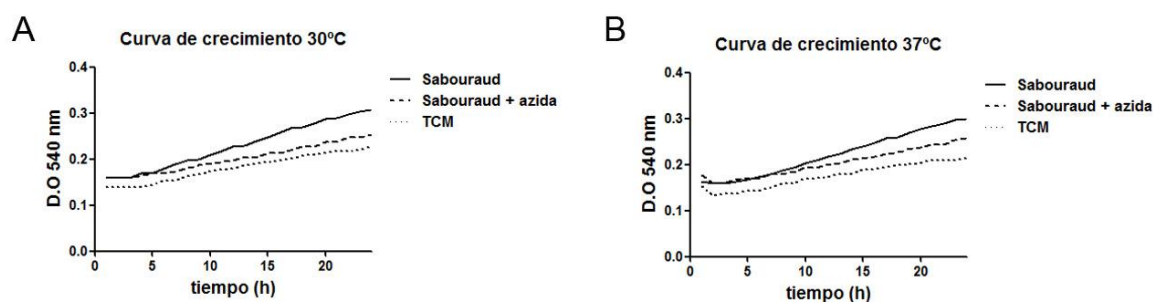


Figura 4.16. Efecto de la azida sódica sobre el crecimiento. Células de la cepa H99 se inocularon en Sabouraud en presencia o ausencia de azida sódica (15 µM) y en medio TCM en placas de 96 pocillos y se monitorizó la densidad óptica a 540 nm durante 24 horas. (A) Curva de crecimiento a 30 °C. (B) Curva de crecimiento a 37 °C.

Para comprobar que el inhibidor no causaba muerte celular, se tomaron 10 µL de los pocillos en los que se realizó la curva de crecimiento y se inocularon en placas de Sabouraud sólido. No se observó muerte celular en presencia del inhibidor a la concentración evaluada (resultado no mostrado).

4.2.3 Visualización del aumento del cuerpo celular durante la formación de células gigantes *in vitro* mediante microscopía en tiempo real

Por último, quisimos observar el crecimiento del cuerpo celular durante la formación de células gigantes *in vitro*. La cápsula no se puede observar en estas condiciones ya que tiene un índice de refracción similar al medio debido a su alto contenido en agua. El experimento se realizó en medio rico (Sabouraud) y en medio TCM (videos suplementarios 1 y 2 respectivamente). El aumento de tamaño del cuerpo celular comenzó a observarse tras 7 u 8 horas de incubación en TCM. Se pudo observar que las células aumentaban el tamaño del cuerpo celular de forma significativa, y una vez alcanzado un determinado tamaño se iniciaba la gemación. Además, durante la formación de células gigantes se pueden observar otros fenómenos. Por ejemplo, hemos visto con mucha frecuencia que existe un compartimento intracelular de gran tamaño en el que aparece un tabique, aunque finalmente esta estructura vuelve a fusionarse y no llega a dividirse (video suplementario 3).

4.2.4 Influencia de la densidad celular en la formación de células gigantes

En los primeros estudios sobre las células gigantes se observó que su proporción aumentaba en ratones en condiciones de infección crónica asintomática, donde el número de UFCs es muy bajo (Zaragoza *et al.*, 2010). Por este motivo, quisimos investigar si la densidad celular tenía alguna influencia en este proceso. Se prepararon diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células/mL de suspensiones celulares de la cepa H99 en medios Sabouraud y TCM. Después de la incubación durante una noche a 37 °C con CO₂, se observaron células gigantes en los pocillos inoculados en medio TCM a una concentración de 10^3 , 10^4 y 10^5 células/mL. Sin embargo, no se observaron estas células en los pocillos inoculados con la densidad celular más alta.

Cuantificamos la diferencia morfológica entre las diferentes concentraciones celulares. Para ello, medimos el cuerpo celular de unas 50-60 células por condición. La concentración óptima para favorecer este cambio morfológico *in vitro* fue 10^4 células/mL (figura 4.17). Debido a este resultado, en experimentos posteriores se trabajó con esta concentración celular.

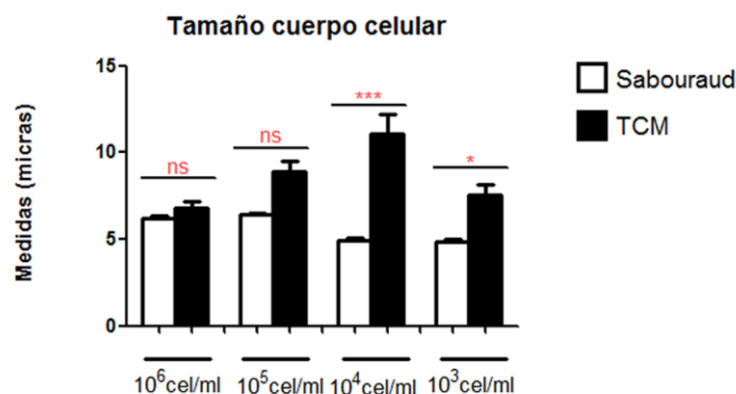


Figura 4.17. Influencia de la densidad celular en la formación de células gigantes de *C. neoformans*. Células de la cepa H99 se inocularon en medio Sabouraud o TCM a diferentes concentraciones (10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 células/mL) en placas de 96 pocillos y se incubó a 37 °C con CO₂ durante una noche. A continuación se midieron los tamaños celulares. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.5 Efecto del farnesol en la formación de células gigantes *in vitro*

El hecho de que la formación de células gigantes dependiese de la densidad celular sugería que este proceso puede estar regulado por fenómenos de *quorum sensing* (QS). El QS es un mecanismo de comunicación célula-célula mediado por moléculas que se liberan al medio por parte de microorganismos. Estas moléculas se acumulan en función del crecimiento y la replicación de los mismos (Atkinson and Williams, 2009; Albuquerque *et al.*, 2014). El farnesol es un alcohol sesquiterpeno y la primera molécula QS descubierta en eucariotas. Así pues, decidimos estudiar el efecto del farnesol en la formación de células gigantes. Se prepararon suspensiones celulares a 10^4 células/mL en Sabouraud y medio TCM en placas de microdilución y se evaluó un rango de concentraciones de farnesol de 300 μ M a 0,5 μ M. Como se observa en la figura 4.18, el farnesol no tuvo ningún efecto en el tamaño celular en medio Sabouraud. Sin embargo, el farnesol inhibió la formación de células gigantes en medio TCM a las concentraciones más altas (300 y 150 μ M) en comparación con el control sin farnesol.

Estos datos confirman que la formación de células gigantes está regulada por fenómenos de *quorum sensing*.

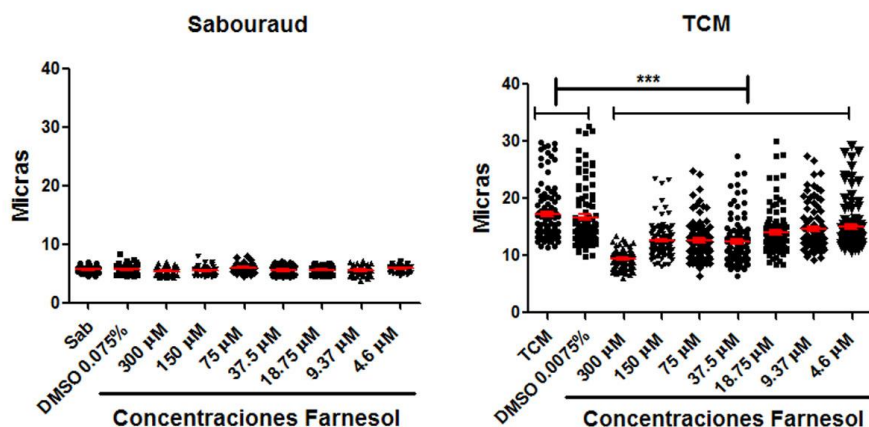


Figura 4.18. Efecto del farnesol sobre la formación de células gigantes. Células de la cepa H99 se inocularon en medio Sabouraud (izquierda) o en TCM (derecha) en presencia de diferentes concentraciones de farnesol en placas de 96 pocillos. Además, se llevó un pocillo control con DMSO (solvente en el que se preparó el farnesol), y otro pocillo en Sabouraud o TCM sin DMSO ni farnesol. La placa se incubó a 37 °C durante una noche sin agitación en presencia de CO₂ y se procedió a medir el tamaño celular. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para descartar que el efecto del farnesol fuera debido a toxicidad o inhibición de la replicación celular, se realizaron curvas de crecimiento con la cepa H99 en medio rico Sabouraud y en medio TCM a 37 °C durante 48 horas y en presencia de diferentes concentraciones de farnesol. Como se observa en la figura 4.19, la cepa H99 creció más lentamente en el medio TCM en comparación con el medio rico.

El farnesol no afectó al crecimiento en ninguna de las condiciones evaluadas, lo que indica que el efecto de esta molécula sobre la formación de células gigantes no está relacionado con una inhibición significativa del crecimiento celular.

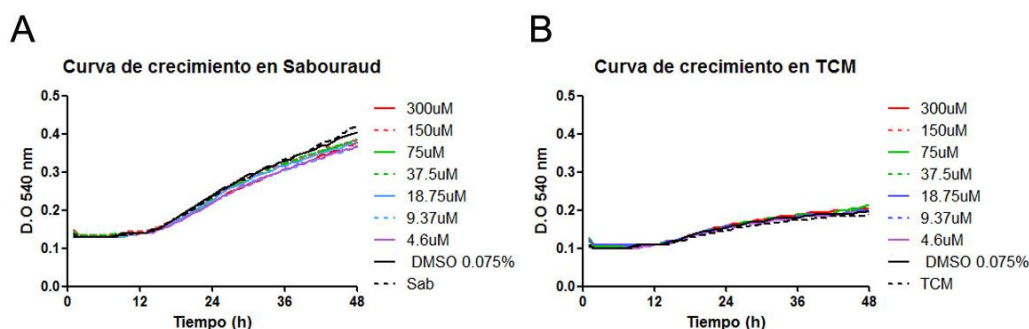


Figura 4.19. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre H99 en presencia de diferentes concentraciones de farnesol en medio Sabouraud (A) y en medio TCM (B) sin agitación. Las células se inocularon a una densidad celular de 2×10^5 células/mL y se incubó durante 48 horas a 37 °C, midiendo la D.O. a 540 nm. También se inocularon como control pocillos con DMSO y pocillos sin DMSO ni farnesol.

4.2.6 Efecto de los fosfolípidos procedentes del suero bovino fetal sobre el aumento del tamaño celular

Aunque las señales que inducen la formación de células gigantes no son del todo conocidas, se ha descrito que fosfolípidos polares, como la fosfatidilcolina, inducen este proceso (Chrisman *et al.*, 2011). Por ello, estudiamos si los lípidos que forman parte del FBS inducían aumento del tamaño celular. Para ello, se realizó una extracción de la porción lipídica del FBS (ver Material y métodos).

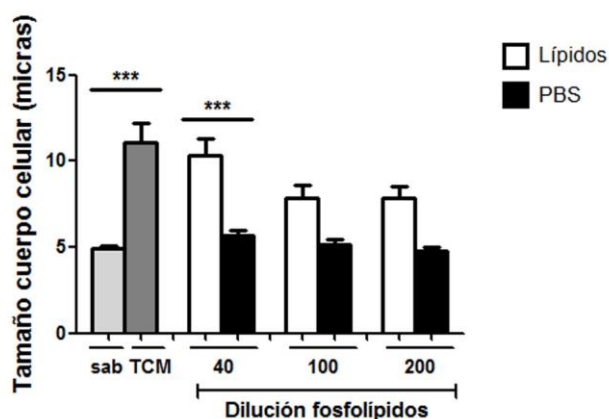


Figura 4.20. Efecto de lípidos purificados del suero sobre el crecimiento celular. Las células de la cepa H99 se inocularon en medio TCM en el que el suero se sustituyó por diferentes diluciones (40, 100 y 200) de fosfolípidos purificados de suero fetal bovino. Como control, se llevaron los mismos medios, pero con PBS en lugar de fosfolípidos. Además, como controles, se inocularon pocillos de Sabouraud o TCM. Las células se inocularon a una densidad de 10^4 células/mL, y el tamaño celular se determinó tras incubar durante 24 h a 37 °C sin agitación en CO₂. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A continuación, se inocularon pocillos de placas de microdilución con medio Sabouraud, medio TCM y medio TCM en el que el FBS se sustituyó por diferentes diluciones de los fosfolípidos extraídos (40, 100 y 200 veces) y medio TCM sin FBS con las mismas diluciones que en el caso anterior pero de PBS (control). En la figura 4.20, se puede observar que los lípidos procedentes del FBS inducían la formación de células gigantes. Además, con la menor dilución de fosfolípidos evaluada (1/40), se observaron resultados similares a los obtenidos en el medio TCM.

4.2.7 Estudio de la formación de células gigantes en diferentes serotipos de *C. neoformans*

Cryptococcus neoformans se divide en diferentes serotipos y variedades (Franzot *et al.*, 1999; Aminnejad *et al.*, 2012). Por este motivo, investigamos si existía una correlación entre los diferentes serotipos de *C. neoformans* y la capacidad de formar células gigantes

Para ello, se inocularon 4 cepas diferentes de los distintos serotipos a una concentración de 10^4 células/mL en Sabouraud y TCM. Tras 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, encontramos que en cada serotipo había cepas con alta y baja capacidad para inducir células gigantes (Figura 4.21). Sin embargo, el serotipo A de *C. neoformans* fue donde se observó mayor proporción de cepas que producían células gigantes en comparación con los serotipos D y A/D.

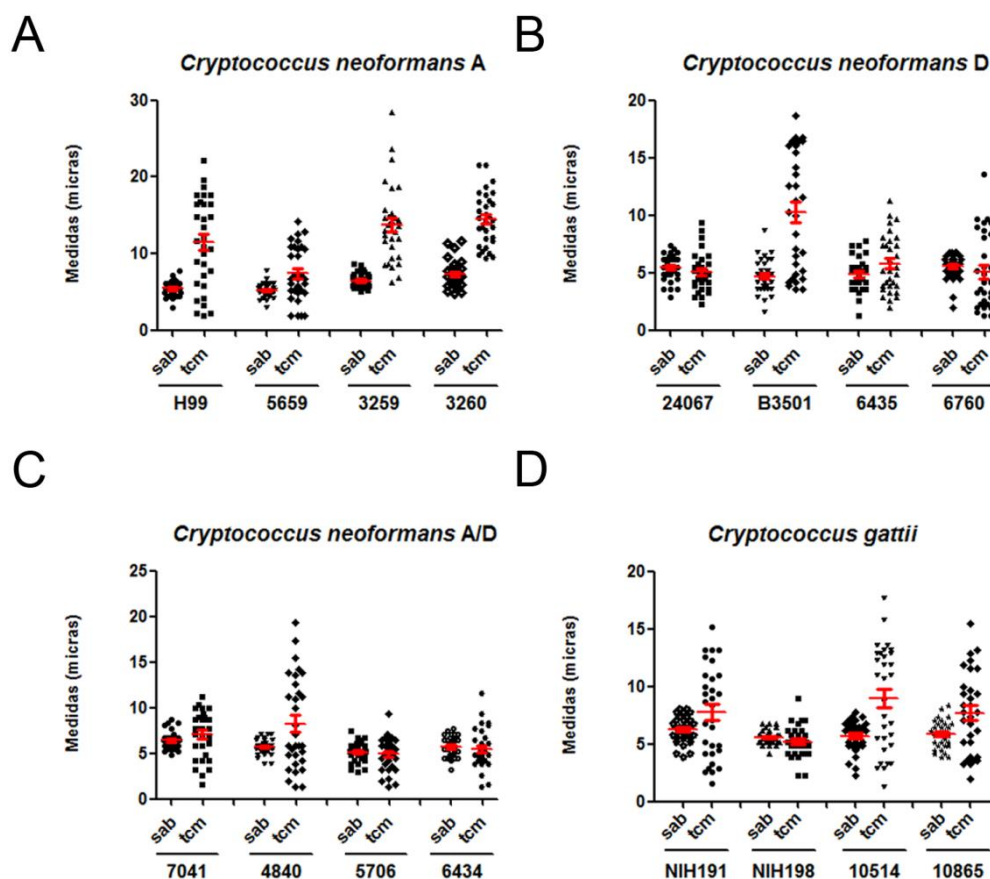


Figura 4.21. Inducción de células gigantes en diferentes cepas y serotipos. Se tomaron 4 cepas de cada especie y serotipo, y se inocularon en Sabouraud o TCM a una concentración celular de 10^4 células/mL a 37 °C con CO₂ durante una noche. (A), *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A); (B) *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D); (C) *C. neoformans* A/D; (D) *C. gattii*. Las líneas rojas representan la media y el error estándar.

Por otra parte, también analizamos si este cambio morfológico ocurría de igual manera en *C. gattii*. En este caso, se incluyeron las cepas NIH191, NIH198 (NIH, Bethesda, Maryland) y cepas aisladas del brote que se produjo en la isla de Vancouver (Fraser *et al.*, 2003; Stephen *et al.*, 2002), ya que una de ellas es más virulenta CBS-10514 (R265), mientras que otra muestra una virulencia reducida CBS-10865 (R272) (Kidd *et al.*, 2004). Como se observa en la figura 4.21D, también en el caso de *C. gattii* hay variabilidad entre cepas en la formación de células gigantes. Curiosamente, la cepa

hipervirulenta mostraba una alta capacidad para aumentar el tamaño celular en comparación con la cepa de virulencia reducida.

4.2.8 Relación entre el tipo de alelo sexual (MAT) y la formación de células gigantes

Hay dos alelos sexuales en el sistema de apareamiento de *Cryptococcus* (MAT α y MAT α). Se sabe que el tipo sexual de las células puede influir en la formación de células gigantes en modelos *in vivo* (Okagaki *et al.*, 2010). Por esta razón, quisimos estudiar si el tipo de alelo sexual de las células estaba asociado a la formación de células gigantes *in vitro*, utilizando cepas de sexo opuesto. En estos experimentos se usaron las cepas NE822/NE824, 3259/3260 y JEC20/JEC21, que son parejas de cepas isogénicas que solo difieren en el tipo sexual.

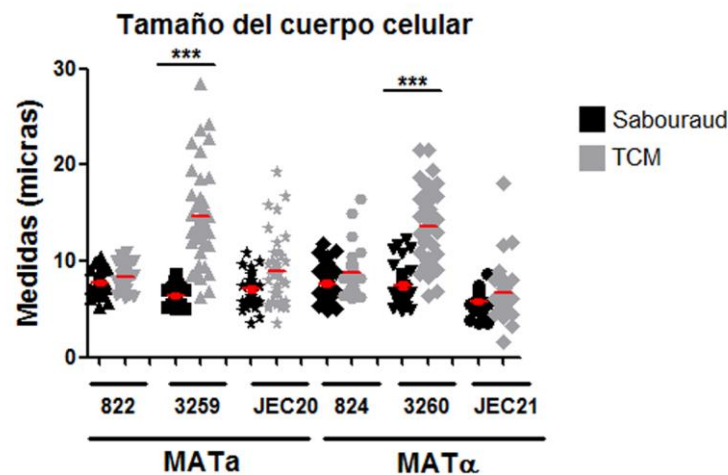


Figura 4.22. Crecimiento del cuerpo celular en cepas de locus sexual α y α . Se tomaron tres pares de cepas que solo difieren en el locus sexual: NE822/NE824 (serotipo D), 3259/3260 (serotipo A) y JEC20/JEC21 (serotipo D). Todas las cepas se inocularon en Sabouraud (símbolos negros) y medio TCM (símbolos grises) a 37 °C con CO₂ durante una noche sin agitación. Los asteriscos indican diferencias significativas (p < 0,05). Las líneas rojas representan la media y el error estándar.

Los aislados NE822/824 se obtuvieron del cruce de JEC33 x NE809 (Wollschlaeger *et al.*, 2014). 3259/3260 son KN99a y KN99 α respectivamente. Finalmente, JEC21 es una cepa isogénica de la cepa silvestre JEC20, pero MAT α . Encontramos que la capacidad de formar células gigantes *in vitro* es independiente del tipo de alelo sexual de las células. Como se observa en la figura 4.22, solo la pareja de cepas 3259/3260 aumentó el tamaño del cuerpo celular en el medio TCM en comparación con el Sabouraud de forma significativa (p < 0,05). En el caso de las otras dos parejas de cepas (822/824 y JEC20/JEC21), hubo un pequeño aumento de tamaño

celular en TCM y se observó una pequeña cantidad de células gigantes en este medio, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

4.2.9 Caracterización de diferentes mutantes en la formación de células gigantes *in vitro*

Para intentar caracterizar los mecanismos moleculares que dan lugar a la formación de células gigantes, investigamos la morfología de diferentes mutantes. En primer lugar, y mediante una colaboración con el grupo del Dr. Janbon (Instituto Pasteur, París), caracterizamos los mutantes *car1* y *gtl1*. El mutante *car1* (CNAG_02500) tiene una mutación en el gen que codifica la calnexina, que es una chaperona que retiene glicoproteínas no plegadas en el retículo endoplasmático (RE). Por otra parte, el mutante *gtl1* (CNAG_03648) es una UDP-glucosa glucosiltransferasa. Ambas proteínas participan en la ruta de control de la glicosilación en el RE.

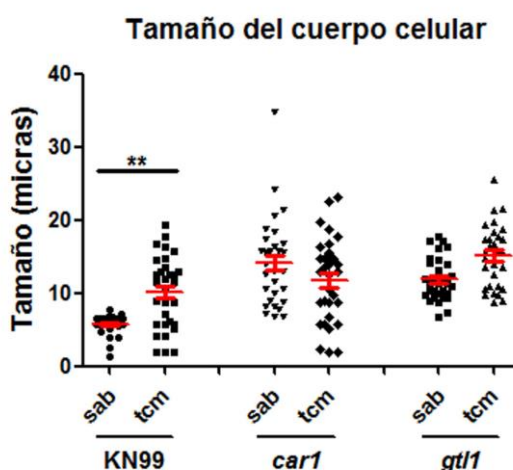


Figura 4.23. Crecimiento del cuerpo celular en mutantes *car1* y *gtl1*. Células de mutantes carentes de las proteínas *car1* (Calnexina) o *gtl1* (UDP-glucosa glucosiltransferasa) fueron inoculadas en Sabouraud o TCM a una densidad de 10^4 células/mL, y el tamaño celular se determinó tras incubación una noche a 37 °C con CO₂ sin agitación. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas rojas representan la media y el error estándar.

Curiosamente, estos dos mutantes muestran un cuerpo celular de mayor tamaño que la cepa silvestre (KN99) en condiciones basales. En el medio TCM solo las células del mutante *gtl1* aumentaron de tamaño en comparación con el medio Sabouraud (figura 4.23). A continuación, evaluamos el fenotipo de mutantes acapsulares y de mutantes con problemas de inducción de cápsula. Los genes *CAP59* y *CAP60* están involucrados en la síntesis de la cápsula y son necesarios para la virulencia (Chang and Kwon-Chung, 1994; Chang and Kwon-Chung, 1998). Por otra parte, el gen *GAT201*, como ya se ha descrito

en el apartado 4.1.2, no es necesario para la síntesis pero sí para la inducción de la cápsula (Liu *et al.*, 2008). Como se muestra en la figura 4.24, ninguno de estos mutantes fue capaz de inducir el crecimiento celular.

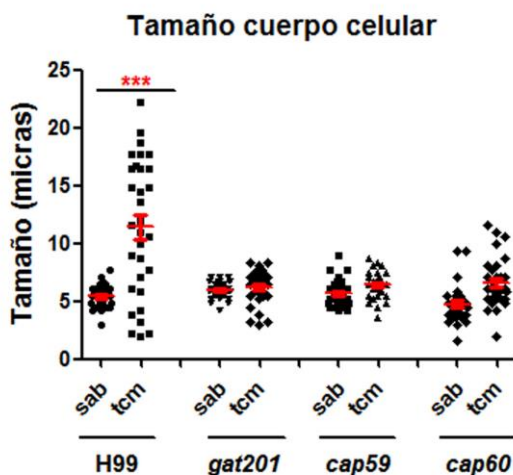


Figura 4.24. Formación de células gigantes en mutantes con defectos capsulares. Células de los mutantes *gat201*, *cap59* y *cap60* se inocularon en Sabouraud y medio TCM a una concentración de 10^4 células /mL en placas de 96 pocillos y el tamaño del cuerpo celular se determinó tras incubación a 37 ° C con CO₂ sin agitación durante una noche. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas rojas representan la media y el error estándar.

4.2.10 Caracterización de mutantes de rutas implicadas en la formación de células gigantes

La formación de células gigantes *in vivo* depende de la ruta del AMPc (Zaragoza *et al.*, 2010), que es sintetizado por la enzima adenilato ciclasa (Cac1). Se ha demostrado que el bicarbonato (HCO_3^-) activa esta enzima. El CO₂ se convierte en HCO_3^- mediante la acción de las anhidrasas carbónicas (Can). En *C. neoformans*, existen dos genes, *CAN1* y *CAN2*, que codifican estas enzimas. *CAN2*, pero no *CAN1* es esencial para el crecimiento de *C. neoformans* en ausencia de CO₂ (Mogensen *et al.*, 2006). Así pues, quisimos investigar el incremento del cuerpo celular en mutantes incapaces de acumular AMPc (*cac1*) y mutantes de ambas anhidrasas carbónicas (*can1* y *can2*). Como se observa en la figura 4.25A, el mutante *cac1* no indujo células gigantes en comparación con la cepa silvestre y la cepa reconstituida (*cac1/CAC1*).

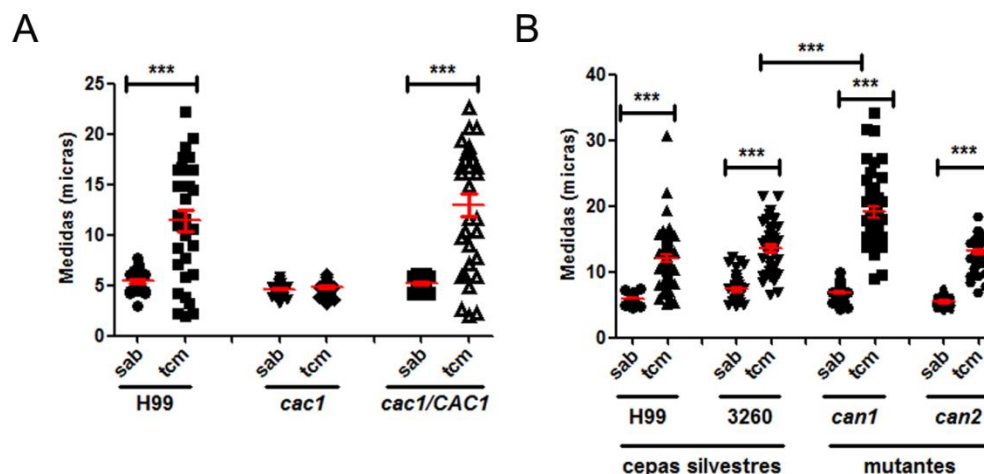


Figura 4.25. Papel de la adenilato ciclasa y anhidrasas carbónicas en el crecimiento celular de *C. neoformans*. (A) Células de la cepa silvestre (H99), del mutante carente de adenilato ciclasa (*cac1*) y la misma cepa reconstituida (*cac1/CAC1*) fueron inoculadas en Sabouraud y TCM a 10^4 células/mL y se incubó en placas de 96 pocillos durante una noche a 37 °C sin agitación con 5% de CO₂. (B) Células de las cepas silvestres H99 y KN99 (3260) y de los mutantes *can1* y *can2* (carentes de las anhidrasas carbónicas) se incubaron en Sabouraud o medio TCM como se describe en (A). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas rojas representan la media y el error estándar.

Por otra parte, se testaron los mutantes *can1* y *can2* junto con su cepa silvestre KN99 (NE3260) y nuestra cepa control H99. Todas las cepas mostraron un incremento significativo en el tamaño del cuerpo celular en medio TCM en comparación con el Sabourad ($p < 0,05$) (figura 4.25B). Además, el mutante *can1* mostró una gran capacidad de formar células gigantes en comparación con la cepa silvestre y el mutante *can2* ($p < 0,05$). Estos datos demuestran que la ruta del AMPc está implicada en la formación de células gigantes y que la anhidrasa carbónica Can2 es un regulador del crecimiento del celular.

4.3 Estudio de genes que se inducen durante la formación de células gigantes

En otra parte del trabajo, nos propusimos identificar los cambios de expresión génica que se producen durante la formación de células gigantes mediante secuenciación masiva del ARN (técnica comúnmente conocida como RNAseq por sus siglas en inglés).

4.3.1 Análisis de expresión génica en células gigantes obtenidas *in vitro*

Como se ha descrito en apartados anteriores, hemos definido un medio para la obtención de células gigantes en condiciones *in vitro*. Posteriormente, la cepa silvestre H99 se inoculó en paralelo en medio líquido Sabouraud y en medio TCM a 37 °C durante

3 días (ver Material y métodos). Estos experimentos no se llevaron a cabo en una atmósfera enriquecida con CO₂ puesto que aún no habíamos definido todos los factores que favorecen la formación de células gigantes en condiciones de laboratorio. A continuación, se llevó a cabo la extracción del ARN utilizando Trizol y la secuenciación masiva usando la tecnología Illumina. En el análisis, solo se tuvieron en cuenta los genes que se expresaron más del doble en las células gigantes comparado con las células de tamaño normal. En la figura 4.26 se muestra la reproducibilidad en las dos replicas que se realizaron. Se obtuvieron 410 genes que se sobreexpresaron en las células gigantes, de los que 166 codifican proteínas de función desconocida. Entre los genes sobreexpresados cabe destacar el gen que codifica Cig1, que es una manoproteína involucrada en la captación de hierro. Por otra parte, 295 genes estaban reprimidos en las células gigantes, encontrando 121 genes que codificaban proteínas de función desconocidas (figura 4.26). Entre los genes reprimidos, estaba *PLC1*, que codifica una ciclina que regula el paso G1/S del ciclo celular. Todos los genes (sobreexpresados y reprimidos) están incluidos en la tabla 1 del material suplementario.

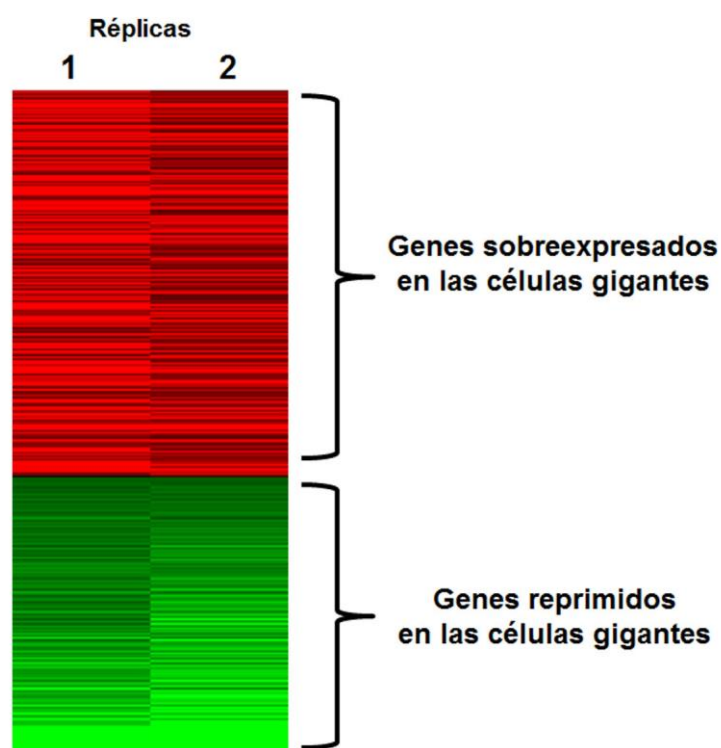


Figura 4.26. Representación gráfica de la reproducibilidad de cambios de expresión génica en células gigantes obtenidas *in vitro*. Se realizaron análisis de secuenciación masiva de ARN en células que crecieron en Sabouraud o en medio TCM. Tras analizar las diferencias de expresión, se tomaron aquellos genes que se expresaron más del doble o menos de la mitad en las células gigantes comparadas con las células normales, y los cambios de expresión en las dos réplicas realizadas se representaron en base a agrupamientos jerárquicos. Se han definido 2 grupos utilizando el algoritmo Kmeans (ver Material y métodos).

A continuación, se realizó una clasificación funcional de los genes que están sobreexpresados en las células gigantes. Se utilizó el programa FungiFun HKI, el cual identifica familias que puedan estar sobre-representadas o hipo-representadas en un grupo de genes. Como se observa en la figura 4.27, se encontró que entre los genes que están sobreexpresados había una sobrerrepresentación de genes que codifican transportadores y componentes integrales de membrana, así como de proteínas involucradas en metabolismo.

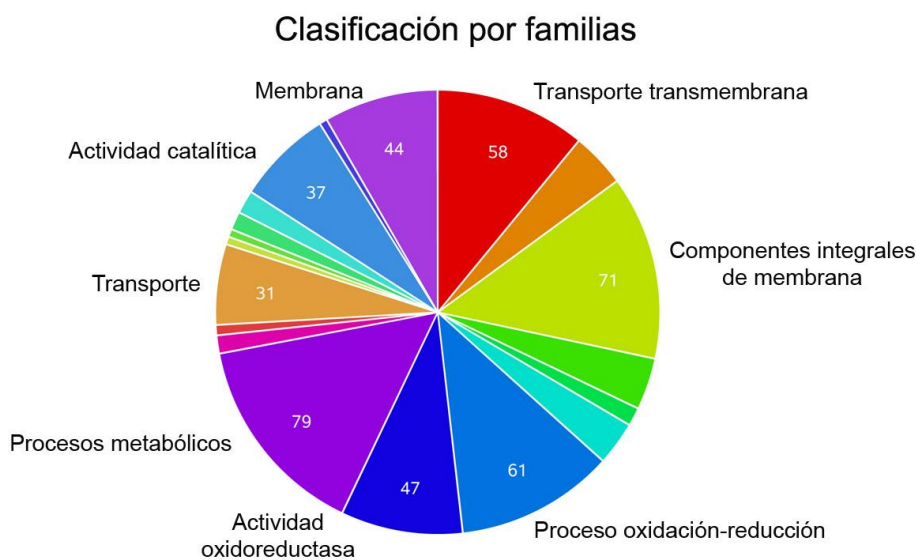


Figura 4.27. Clasificación de las familias de genes que están sobrerrepresentadas entre los genes sobreexpresados en células gigantes. Gráfico de sectores realizado con el servidor FungiFun KHI. Representación circular de las familias a las que pertenecen los genes sobreexpresados en las células gigantes obtenidos del análisis del RNAseq de las células pequeñas (Sabouraud) y células gigantes (TCM) obtenidas en condiciones *in vitro*. Los números del interior del gráfico indican el número de genes de esa familia que están sobreexpresados.

4.3.2 Análisis de expresión génica en células gigantes obtenidas *in vivo*

Una limitación en la obtención de células gigantes *in vitro* es que su tamaño no llega a ser el mismo que el de las células gigantes que se forman en los pulmones. Por este motivo, quisimos complementar el trabajo investigando los cambios de expresión génica que ocurren en este tipo de células durante la infección en ratones.

Para este objetivo, primero fue preciso poner a punto un protocolo que nos permitiera separar de manera eficiente las células de *C. neoformans* de los pulmones en función de su tamaño.

Para ello, realizamos infecciones en grupos de 20 ratones C57BL/6J y tras 14 días, los animales fueron sacrificados y se les realizó una perfusión con PBS para

eliminar la sangre de los órganos, con el fin de tener extractos con la menor contaminación de células sanguíneas (ver Material y métodos). A continuación, los pulmones se homogeneizaron en PBS y se realizaron varios lavados con H₂O para lizar y eliminar las células de ratón.

Para la separación de las células gigantes de *C. neoformans* de las células de menor tamaño se llevaron a cabo diferentes protocolos. En primer lugar, se intentó la separación mediante filtración a través de membranas de diferentes tamaños que retuvieran las células por el tamaño del cuerpo celular. También se realizaron gradientes de densidad de Ficoll, que discrimina las células en función de su densidad. Sin embargo, ninguno de estos protocolos resultó efectivo ya que se perdió una gran cantidad de células, lo que dificultaba la extracción del ARN. Un método alternativo de separación de células en función del tamaño es la elutriación. Esta técnica está basada en una centrifugación en la que las células están sometidas a fuerzas opuestas: la fuerza centrífuga que lleva las células hacia el fondo de la cámara, y la fuerza de un flujo contracorriente que “empuja” las células hacia la parte superior (ver materiales y métodos). De esta manera, y modulando la fuerza del flujo, se pueden recoger diferentes fracciones celulares que se diferencian en su tamaño.

Para estandarizar el protocolo de separación, se llevó a cabo la elutriación de las suspensiones celulares, y se recogieron 10 fracciones tal y como se indica en Materiales y métodos (tabla 3.3). Como se observa en la figura 4.28, la elutriación permitió separar las células por el tamaño del cuerpo celular. El tamaño medio del cuerpo celular de las células de menor tamaño fue alrededor de 5-7 μm , mientras que la media de tamaño del cuerpo celular de las últimas fracciones fue siempre muy superior a 15 μm .

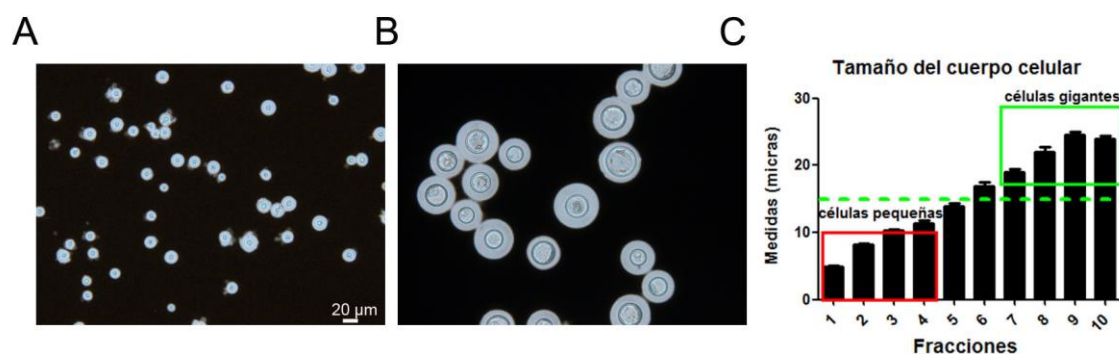


Figura 4.28. Separación de células mediante elutriación. Las células de *C. neoformans* se aislaron a partir de pulmones y se separaron según su tamaño mediante elutriación según se indica en Material y métodos. (A) Células de menor tamaño (fracción 1) y (B) Células gigantes (fracción 10). (C) Distribución del tamaño del cuerpo celular de todas las fracciones obtenidas mediante la separación por elutriación. Los cuadrados rojos y verdes señalan las fracciones que se juntaron para tener células pequeñas y gigantes respectivamente. La línea verde indica la medida a partir de la cual se consideran células gigantes.

Estos resultados confirmaron la eficiencia de la separación de células por tamaño mediante elutriación, lo cual nos permitió poder analizar células de *C. neoformans* de diferente tamaño obtenidas a partir del mismo pulmón.

Tras la visualización de las diferentes fracciones al microscopio y teniendo en cuenta el tamaño del cuerpo celular, se observó que las fracciones de la 1 a la 4 contenían células pequeñas y de la 7 a la 10 las células gigantes. En las fracciones intermedias, se observaron células que tenían gran tamaño pero principalmente debido al tamaño de la cápsula. Estas fracciones fueron descartadas para asegurarnos diferencia de tamaño entre las dos poblaciones del estudio (figura 4.29). Así pues, tras la elutriación, juntamos las diferentes fracciones en tres muestras: células pequeñas (mezcla de fracciones 1 a 4), intermedias (fracciones 5 y 6) y gigantes (fracciones 7 a 10).

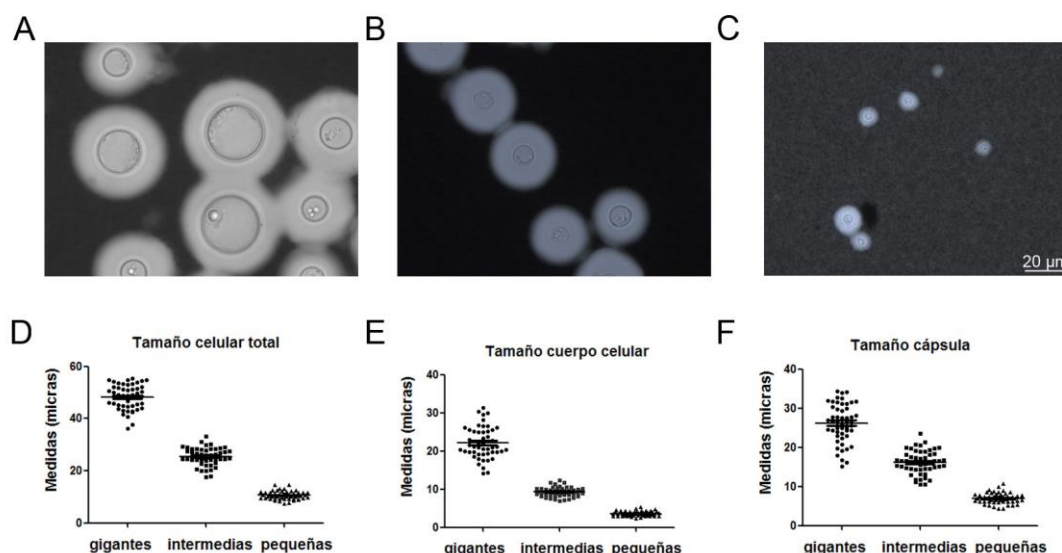


Figura 4.29. Distribución de tamaños tras juntar las fracciones de *C. neoformans* separadas mediante elutriación descritas en la figura 4.28. (A, B, C) Tinción con tinta china de células de las fracciones 7-10 (A), células de las fracciones 6 y 7 (B) y células de las fracciones 1-4 (C). (D, E y F), Distribución del tamaño celular total (D), del cuerpo celular (E) y de la cápsula (F) de las células gigantes (fracciones 7-10), intermedias (fracciones 5 y 6) y pequeñas (fracciones 1-4).

Una vez separadas las 2 poblaciones de células para el estudio, procedimos a investigar la expresión génica de algunos factores de virulencia mediante PCR en tiempo real. Para ello, se extrajo el ARN de ambas suspensiones celulares y se sintetizaron los ADNc. Seleccionamos los principales factores de virulencia de *C. neoformans* como son, la lacasa, ureasa, fosfolipasa B, así como genes necesarios para la síntesis de la cápsula (Vecchiarelli, 2000; McFadden and Casadevall, 2001; Zaragoza *et al.*, 2009). Además, medimos la expresión de otros genes que se han descrito recientemente y que están involucrados en la patogénesis de *C. neoformans*. Como se observa en la figura 4.30 la

Resultados

mayoría de genes que codifican factores de virulencia se expresaron más en las células gigantes en comparación con las células pequeñas. Sin embargo, *APP1* aparece menos expresado en las células gigantes.

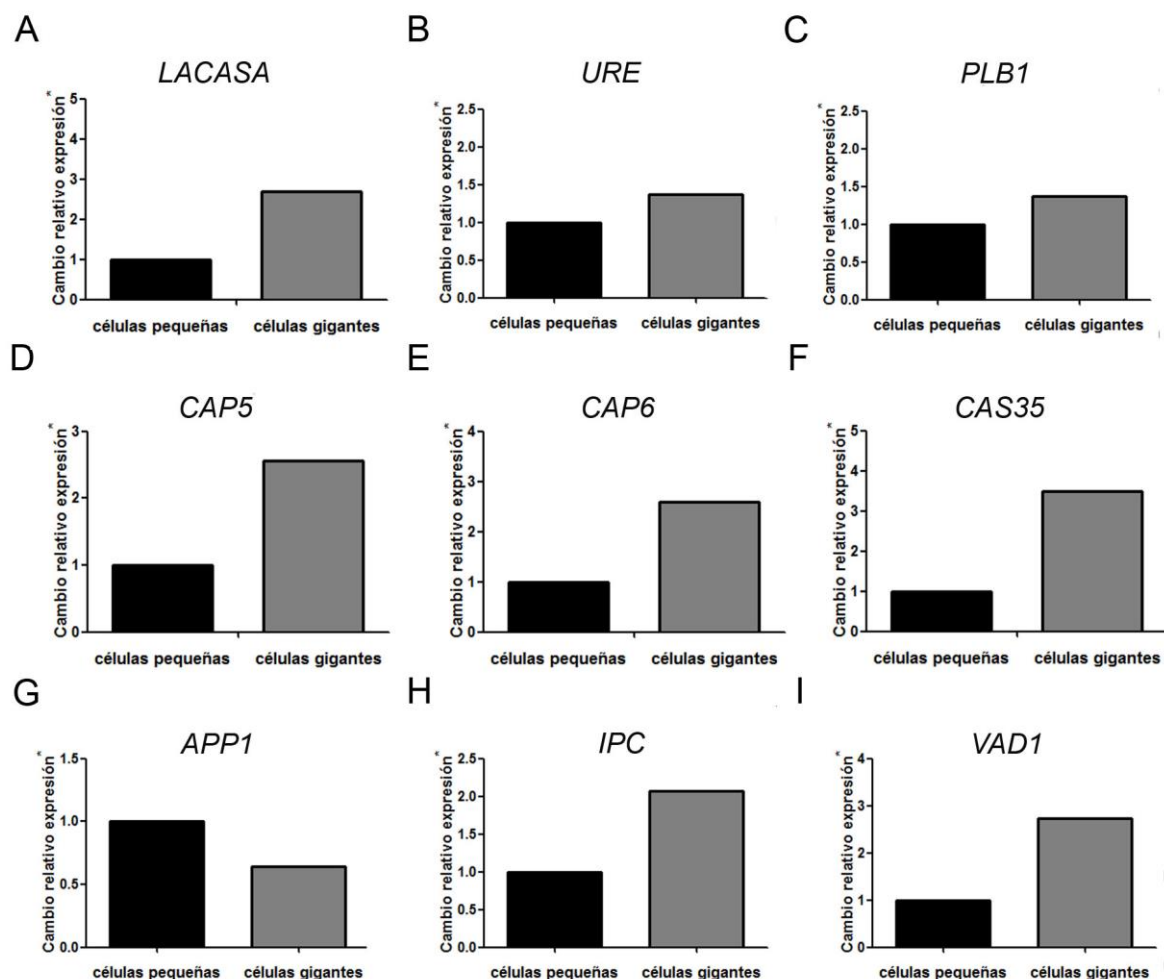


Figura 4.30. Análisis de la expresión de genes que codifican factores de virulencia de *C. neoformans*, lacasa (A), ureasa (B), *PLB1* (C), *CAP5* (D), *CAP6* (E), *CAS35* (F), *APP1* (G), *IPC1* (H) y *VAD1*(I) de células gigantes y células pequeñas obtenidas del pulmón de ratones infectados con H99. Las barras muestran la media de dos experimentos.

4.3.3 Identificación de genes que se inducen durante la formación de células gigantes *in vivo*.

En la siguiente parte del trabajo, quisimos estudiar la expresión de todos los genes de las células gigantes aisladas de pulmones de animales infectados. Para ello, realizamos infecciones y se separaron las poblaciones de células gigantes y pequeñas tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

Una vez separadas las dos poblaciones de células para el estudio, se extrajo el ARN y se realizó la secuenciación masiva usando la tecnología Illumina (ver Material y métodos). Todo el análisis se realizó en 3 réplicas independientes (figura 4.31). Al igual que en el caso de los experimentos de análisis de expresión de células gigantes *in vitro*, se tuvieron en cuenta los genes que se expresaron más de 2 veces en las células gigantes con respecto a las células de tamaño normal. En cuanto a la profundidad del análisis, hay que señalar que en este caso, el número total de lecturas que se obtuvieron de *C. neoformans* fue mucho menor en comparación con el análisis en condiciones *in vitro*, ya que hubo un alto porcentaje de lecturas que correspondían a ratón (entre el 80-95%). Aún así, se obtuvieron entre 500.000-2.000.000 millones de lecturas que mapeaban en el genoma de *C. neoformans*, y se procedió a investigar el perfil de expresión en estas muestras. Se obtuvieron 916 genes que estaban sobreexpresados en las células gigantes, de los cuales 288 codifican proteínas de función desconocida. El gen más expresado diferencialmente en estas células codifica una metaloproteinasa elastinolítica extracelular.

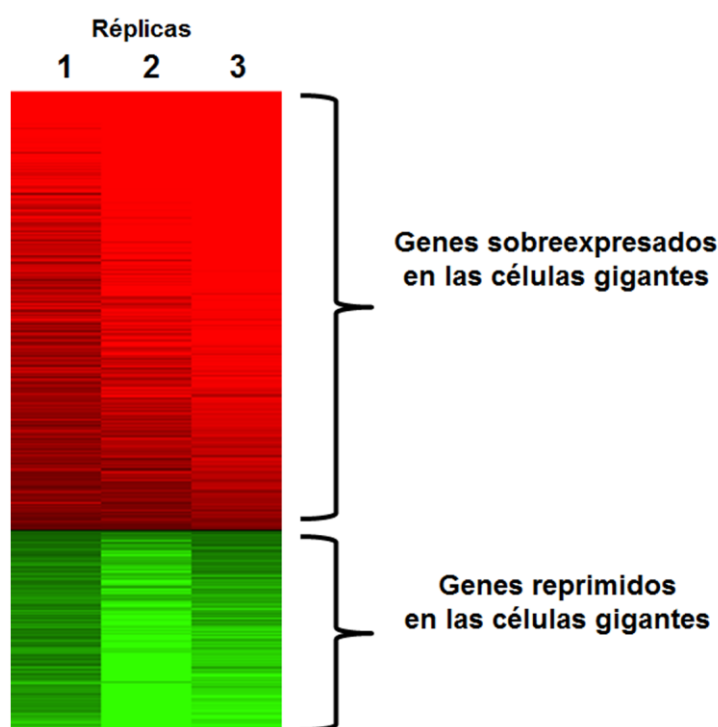


Figura 4.31. Representación gráfica de la reproducibilidad de cambios de expresión génica en células gigantes obtenidas *in vivo*. Se realizaron análisis de secuenciación masiva de ARN en células gigantes o de tamaño normal obtenidas de pulmones. Tras analizar las diferencias de expresión, se tomaron aquellos genes que se expresaron más del doble o menos de la mitad en las células gigantes comparadas con las células normales, y los cambios de expresión en las tres réplicas realizadas se representaron en base a agrupamientos jerárquicos. Se han definido 2 grupos utilizando el algoritmo Kmeans (ver Material y métodos).

Además, se encontraron muchos genes que codifican proteínas relacionadas con actividad mitocondrial, así como el gen que codifica Cig1, que también se obtuvo en el análisis *in vitro* y que está relacionado con la captación de hierro. También, se obtuvieron 427 genes reprimidos en las células gigantes de los cuales 216 codifican proteínas de las que no se conoce su función. Todos los genes (sobrexpresados y reprimidos) están incluidos en la tabla 2 del material suplementario.

Al igual que en el caso de *in vitro* se realizó una clasificación funcional de los genes sobreexpresados (figura 4.32). En este caso, se encontraron una gran cantidad de genes que codifican proteínas con función mitocondrial, cadena respiratoria, ribosoma y traducción.

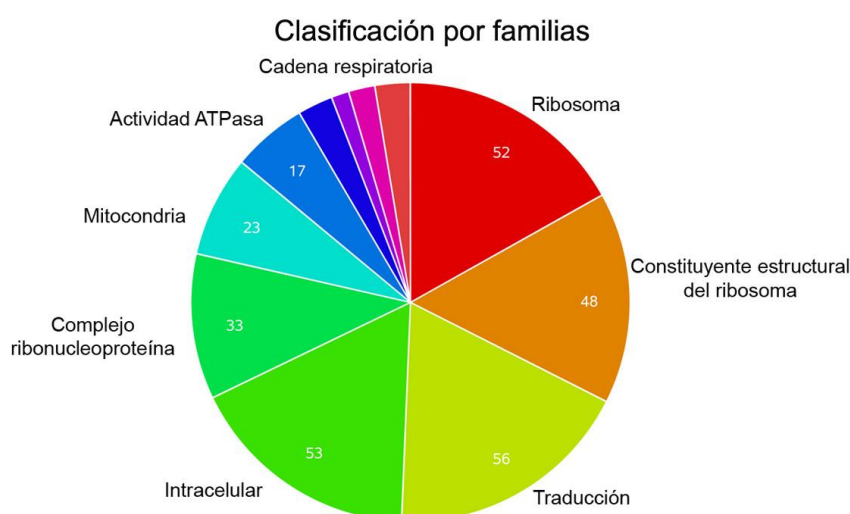


Figura 4.32. Clasificación de las familias de genes que están sobrerrepresentadas entre los genes sobreexpresados en células gigantes *in vivo*. Gráfico de sectores realizado con el servidor FungiFun KHI (ver material y métodos). Representación circular de las familias a las que pertenecen los genes sobreexpresados en las células gigantes obtenidos en la figura 4.31. Los números del interior del gráfico indican el número de genes de esa familia que están sobreexpresados.

4.3.4 Comparación de la expresión génica en células gigantes obtenidas *in vitro/in vivo*.

Por último, decimos llevar a cabo un análisis comparativo de los resultados obtenidos de la secuenciación masiva del ARN para conocer el número total de genes que coinciden en ambos análisis. Entre los 916 y 410 genes que aumentaron su expresión en células gigantes *in vivo* e *in vitro* respectivamente, se encontraron 80 que estaban sobreexpresados en ambas condiciones (figura 4.33). Muchos de estos genes codifican enzimas relacionadas con el Acetil-CoA, que es una molécula muy importante

involucrada en múltiples procesos metabólicos. Además, se obtuvieron genes que codifican proteínas relacionadas con transporte, ciclo celular y de resistencia a múltiples drogas. En el caso de los genes reprimidos en estas células, se obtuvieron un total de 427 genes *in vivo* y 295 *in vitro*, de los cuales hubo una coincidencia de 21 genes (figura 4.34). Los genes coincidentes de ambos análisis (sobreexpresados y reprimidos) están incluidos en la tabla 3 del material suplementario.

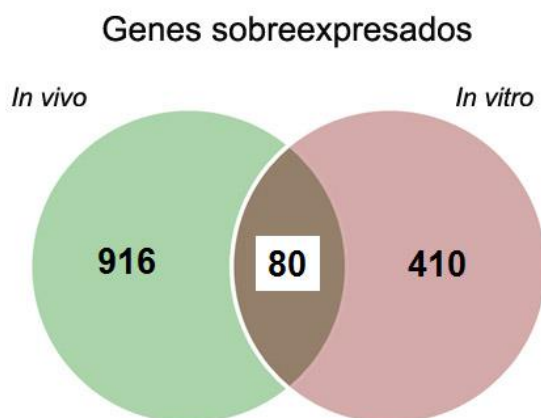


Figura 4.33. Representación esquemática del solapamiento de los genes sobreexpresados en las células gigantes en condiciones *in vivo* (verde) e *in vitro* (rojo). El número central representa los genes coincidentes en ambos análisis de RNAseq.

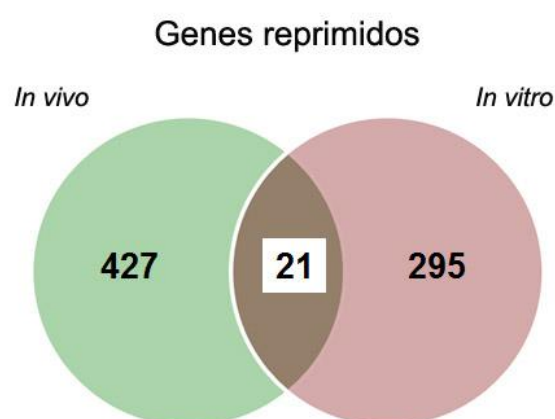


Figura 4.34. Representación esquemática del solapamiento de los genes reprimidos en las células gigantes en condiciones *in vivo* (verde) e *in vitro* (rojo). El número central representa los genes coincidentes en ambos análisis de RNAseq.

4.4 Influencia del huésped en la formación de células gigantes de *C. neoformans* *in vivo*

Aunque las células gigantes ya han sido descritas y caracterizadas, se conoce muy poco sobre los factores del huésped que influyen en la formación de este tipo de células. Estudios previos han mostrado que en ratones con baja carga fúngica e infecciones asintomáticas, la proporción de células gigantes es significativamente mayor que en animales con infección aguda (Zaragoza *et al.*, 2010). Otros trabajos han demostrado que la infección de ratones KO *rag1* (que son deficientes en la producción de anticuerpos IgM) resulta en células de *C. neoformans* de un tamaño más grande que en ratones silvestres (Szymczak *et al.*, 2013). Estos datos sugirieron que el fondo genético de los ratones juega un papel importante en el tamaño de las células de *C. neoformans*. Por ello, en el último apartado de la tesis se describen los resultados relacionados con los factores del huésped que influyen en la formación de células gigantes. Para ello, de manera general, se ha investigado como se forman este tipo de células en diferentes modelos animales.

4.4.1 Caracterización de células gigantes en diferentes tipos de ratón

En la primera parte de esta sección, quisimos estudiar la morfogénesis de *C. neoformans* durante la infección de diferentes tipos de ratón. Para ello, examinamos si la proporción de células gigantes en dos cepas diferentes de ratón: CD1 y C57BL/6J. Los ratones CD1 son una línea de ratones no consanguíneos (líneas exogámicas o *outbred*) con variabilidad genética, mientras que los ratones C57BL/6J son una línea de ratones consanguíneos genéticamente iguales (líneas endogámicas o *inbred*).

4.4.1.1 Estudio de la morfología de *C. neoformans* en ratones CD1 y C57BL/6J

En primer lugar, realizamos infecciones de ratones CD1 y C57BL/6J con la cepa silvestre H99. Los ratones se sacrificaron a los 14 días, se extrajeron los pulmones y los homogeneizados fueron examinados al microscopio.

Se tomaron fotos y se midieron alrededor de 400-500 células de *C. neoformans* por grupo. Encontramos células gigantes de *C. neoformans* en ambas cepas de ratón (figura 4.35). Sin embargo, en la cepa C57BL/6J había una mayor proporción de células gigantes en comparación con la observada en la cepa CD1.

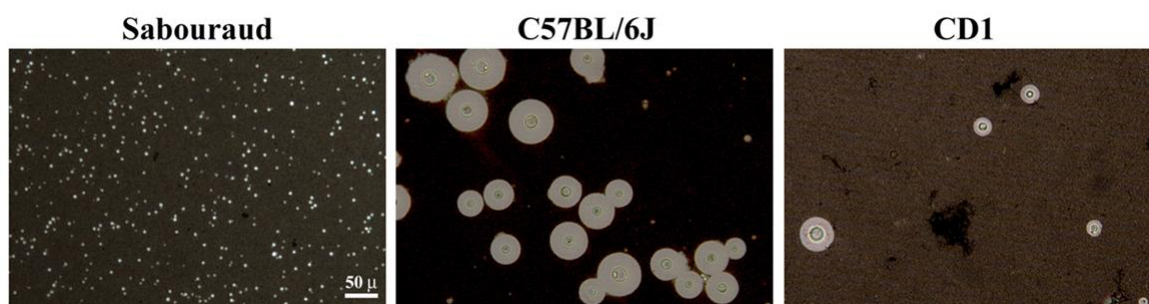


Figura 4.35. Morfología de *Cryptococcus neoformans* en las dos cepas de ratón estudiadas C57BL/6J y CD1. Células de *C. neoformans* H99 (10^6 células/ratón) incubadas *in vitro* en Sabouraud fueron inoculadas en ratones macho C57BL/6J y CD1 (ver material y métodos). Tras 14 días de infección, se aislaron y homogeneizaron los pulmones. El tamaño de las levaduras se visualizó tras suspender los extractos en tinta china.

Las células gigantes se han definido anteriormente como aquellas células con un cuerpo celular mayor de 15 micras (Zaragoza and Nielsen, 2013). En este caso, se incluyó el tamaño de la cápsula en la definición, por lo que se consideran células gigantes a aquellas con un tamaño celular total de 30 micras de diámetro. La proporción de células gigantes en la cepa CD1 fue aproximadamente de un 15 %, y el tamaño celular medio entre 15 y 20 micras. Sin embargo, en la cepa C57BL/6J alrededor del 50 % de las células fueron gigantes y el tamaño medio de las levaduras era entre 30-35 micras (figura 4.36).

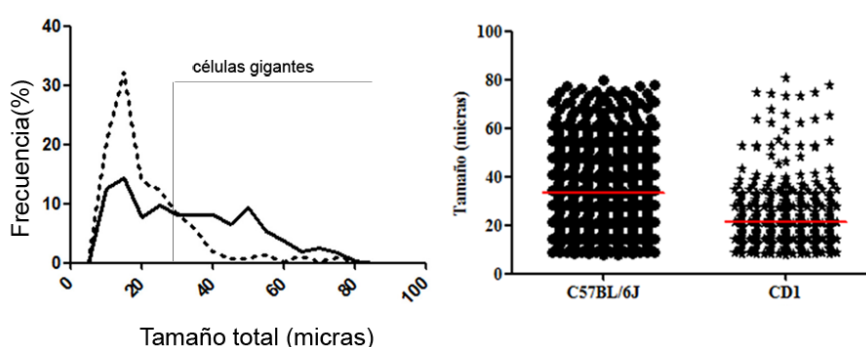


Figura 4.36. Análisis del tamaño de las células de *C. neoformans* (H99) en las diferentes cepas de ratón tras 14 días de infección. Frecuencia del tamaño total de las levaduras (panel izquierdo) en ratones CD1 (línea de puntos) y en ratones C57BL/6J (línea negra). Distribución del tamaño de las levaduras (panel derecho). La línea roja horizontal indica la media de la distribución de cada cepa de ratón.

4.4.1.2 Efecto de la formación de células gigantes en la susceptibilidad a la infección

A continuación, estudiamos si estos resultados se correlacionaban con la susceptibilidad a la infección. Ratones de ambas cepas de ratón (CD1 y C57BL/6J) fueron infectados y se monitorizó la supervivencia a lo largo del tiempo. Para determinar el grado de severidad de la enfermedad y el día de sacrificio de los animales, se tuvieron en cuenta los criterios del bienestar animal descritos en material y métodos. Como se observa en la figura 4.37, la cepa C57BL/6J mostró una susceptibilidad algo mayor a la infección por *C. neoformans* ($p=0,036$).

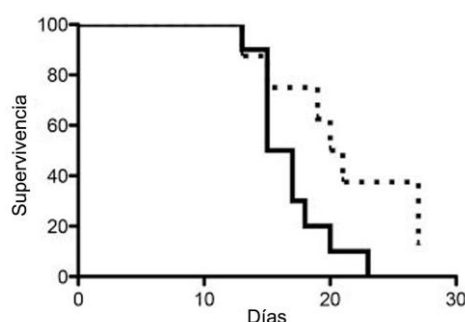


Figura 4.37. Susceptibilidad a la infección por *C. neoformans* en ratones C57BL/6J y CD1. Ratones de ambas cepas fueron infectados con 10^6 células de la cepa H99 de *C. neoformans* por ratón y la supervivencia fue monitorizada a lo largo del tiempo. Ratones C57BL/6J (línea negra) y ratones CD1 (línea de puntos).

4.4.1.3 Evaluación del peso y de la carga fúngica en pulmones y cerebro

Los pulmones son el primer órgano afectado después de la inhalación de células de *C. neoformans*. Por ello, evaluamos las características macroscópicas y microscópicas de este órgano. Macroscópicamente, se apreció un aumento de tamaño de los pulmones y abundante formación de granulomas en ratones infectados de ambas cepas. Para normalizar el tamaño del órgano según el peso del ratón, se calcularon los índices organosomáticos de los pulmones y bazo.

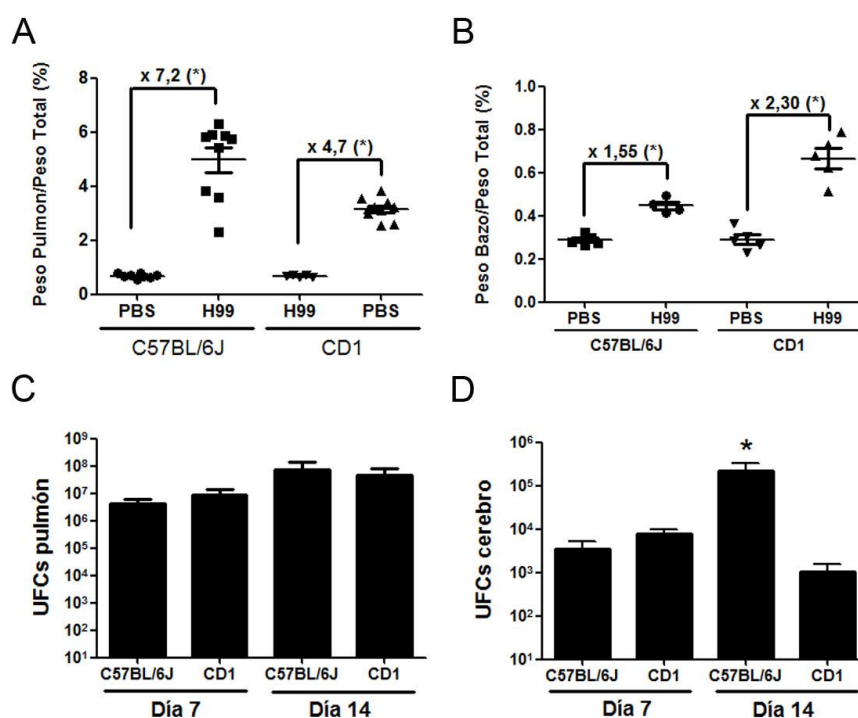


Figura 4.38. Efecto de *C. neoformans* sobre el tamaño de órganos diana y diseminación de las levaduras durante la infección. Los animales se infectaron como se indica en el pie de la figura 4.37, y tras 14 días de infección se calculó el peso de los pulmones (A) y los bazo (B) con respecto al peso total del ratón. (C y D). Carga fúngica en pulmones (C) y cerebros (D) a día 7 y día 14. Los asteriscos indican diferencia significativa entre ratones control e infectados.

Como se muestra en la figura 4.38A, el aumento fue más marcado en los ratones C57BL/6J. Mientras que los pulmones de los ratones CD1 aumentaron casi 5 veces respecto a los ratones no infectados, el incremento que se produjo en la cepa C57BL/6J era de más de 7 veces.

Se estudió también el bazo, ya que este órgano linfoide está involucrado tanto en la regulación de la sangre (destrucción de células sanguíneas rojas viejas, producción de nuevas y mantener una reserva de sangre) como en la producción de células inmunes. Como se muestra en la figura 4.38B, en ambos casos el bazo era más grande en ratones infectados. Pero en este caso, y al contrario que en los pulmones, el bazo de los ratones infectados CD1 aumentó más que en los ratones C57BL/6J.

Para estimar la cantidad de células de *C. neoformans* en los diferentes órganos, cuantificamos el número de UFCs en pulmón y cerebro. Como se observa en la figura 4.38C, en pulmón no se obtuvieron diferencias significativas en las UFCs entre ambas cepas a ninguno de los tiempos evaluados. En cerebro, figura 4.38D, se observó una mayor cantidad de levaduras en los ratones C57BL/6J.

4.4.1.4 Estudio del patrón de citoquinas acumulado en el pulmón en los modelos de ratón CD1 y C57BL/6J

Por otro lado, quisimos investigar si había una correlación entre la morfología de *C. neoformans* con el tipo de respuesta inmune desarrollado por cada ratón. Para ello, se cuantificó en primer lugar la concentración de citoquinas Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-12), Th2 (IL-4 e IL-10) y Th17 (IL-17) en el pulmón. Los resultados mostraron una clara diferencia en el patrón de citoquinas acumulado (figura 4.39). En la cepa CD1, la infección por *C. neoformans* indujo principalmente citoquinas del tipo Th1 y Th17 como TNF- α , IFN- γ e IL-17. El incremento de estas citoquinas en la cepa C57BL/6J fue mucho menor. Sin embargo, la concentración de la principal citoquina del tipo Th2, la IL-4, aumentó significativamente en los ratones C57BL/6J. La IL-6 aumentó en ambas cepas de ratón durante la infección, así como la IL-2 y la IL-12 disminuyeron en animales infectados tras 14 días. En el caso de la IL-10, no observamos ninguna diferencia en ninguna condición.

Estos datos sugieren que los ratones CD1 tienen un tipo de respuesta inmune de tipo Th1, mientras que los ratones C57BL/6J presentan un tipo de respuesta de tipo Th2.

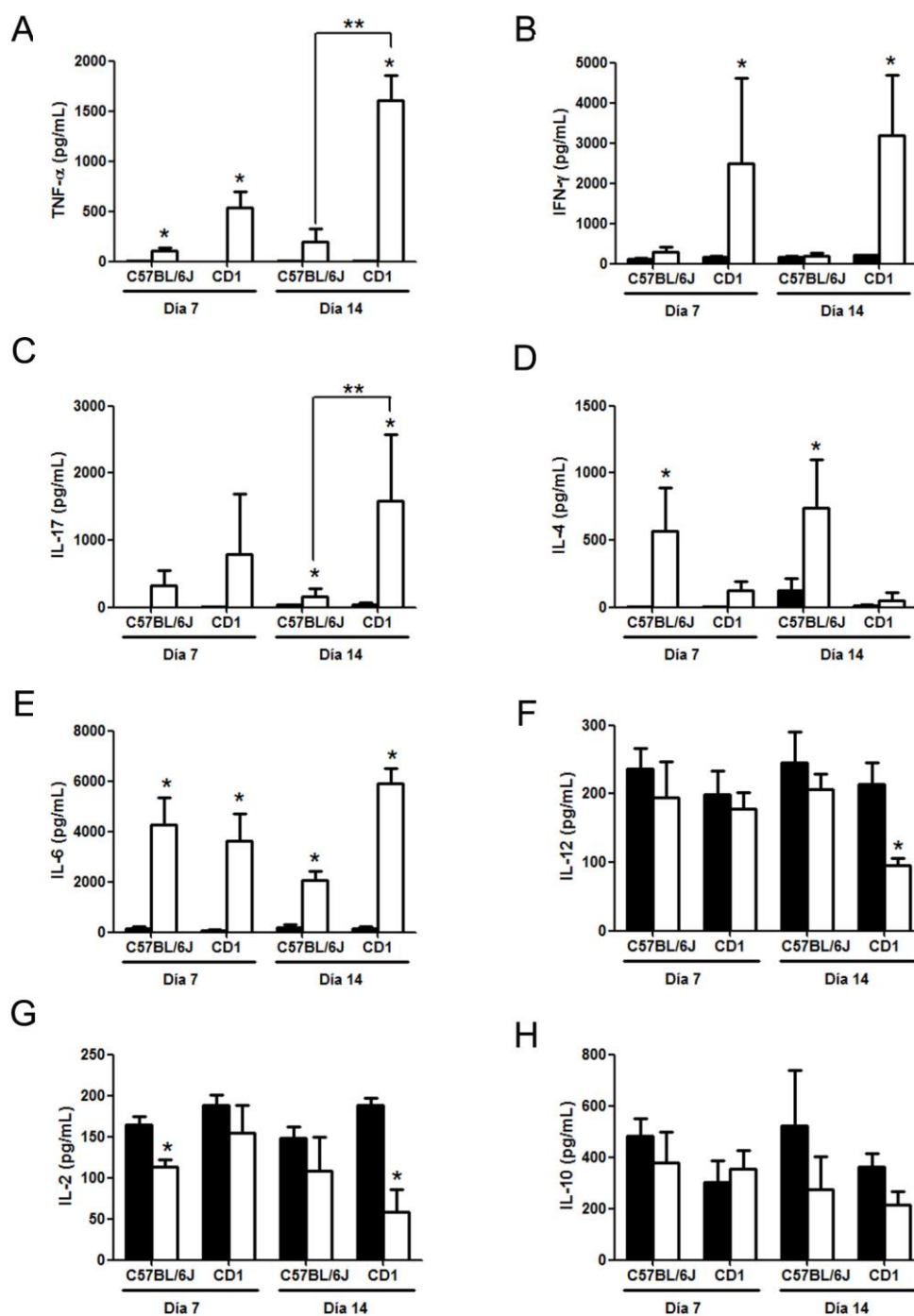


Figura 4.39. Concentración de citoquinas en el pulmón de ratones C57BL/6J y CD1. Grupos de 5 ratones fueron infectados con *C. neoformans* (10^6 levaduras de la cepa H99 por ratón, barras blancas) o tratados con PBS como control (barras negras). Tras 14 días de infección, se extrajeron y homogeneizaron los pulmones, y se determinó la concentración de TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-12 (F), IL-2 (G) e IL-10 (H). En la figura se representa la media y la desviación estándar de 5 ratones diferentes a cada tiempo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre ratones control e infectados.

4.4.1.5 Respuesta de anticuerpos durante de la infección por *C. neoformans* en CD1 y C57BL/6J

El papel de los anticuerpos durante la criptococosis es controvertido, ya que la administración de mAbs anti-GXM a los animales puede alterar el desarrollo de la enfermedad, causando protección o empeorando la enfermedad (Maitta *et al.*, 2004; Taborda *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha asociado un incremento en la producción de anticuerpos a una mayor susceptibilidad a la infección y a un tipo de respuesta inmune Th2. Por otra parte, se sabe que los niveles de IgE total están involucrados en reacciones alérgicas y su acumulación ocurre en respuestas de tipo Th2. Por ello, decidimos medir la cantidad de anticuerpos anti-GXM y de IgE total mediante ELISA.

En el suero de los ratones C57BL/6J infectados se detectaron mayores niveles de anticuerpos IgM anti-GXM a 7 y 14 días que en los ratones no infectados. Este aumento no fue detectado en los ratones CD1. Además, observamos que la infección por *C. neoformans* causa un aumento de la concentración de IgE en ratones C57BL/6J. En la cepa CD1, el aumento de la concentración de IgE total no fue significativo en comparación con ratones no infectados (figura 4.40).

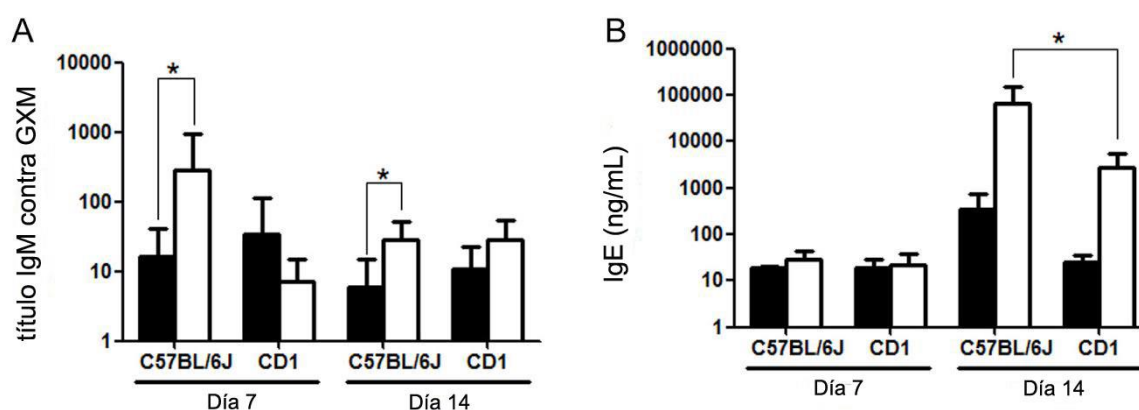


Figura 4.40. Respuesta de anticuerpos tras la infección por *C. neoformans*. Ratones de las cepas CD1 y C57BL/6J infectados con 10^6 células de *C. neoformans* (H99, barras blancas) o tratados con PBS (barras negras), y tras 7 y 14 días de infección se extrajo la sangre. (A) Cuantificación del título de anticuerpos IgM contra GXM cuantificado mediante ELISA. (B) Concentración de IgE en las muestras de suero. Los asteriscos indican diferencia significativa (ver Material y métodos).

4.4.2 Función de la IL-17 en la formación de células gigantes de *C. neoformans*

Tras comprobar que la formación de células gigantes en *C. neoformans* depende de la cepa de ratón y que respuestas de tipo Th1 y Th17 se correlacionan con una menor

proporción de células gigantes de *C. neoformans*, en la siguiente parte de este trabajo nos centramos en el papel que juega la citoquina IL-17 en la formación de este tipo de células. Para ello, utilizamos ratones deficientes de esta citoquina. Los ratones KO *Il17a*^{-/-} fueron generados por el grupo de investigación de Yoichiro Iwakura (Universidad de Tokio) en un fondo genético C57BL/6J. Esta parte del trabajo se llevó a cabo durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Anna Vecchiarelli (Universidad de Perugia, Italia) donde estaban disponibles estos ratones.

4.4.2.1 Estudio de la morfología de *C. neoformans* en los modelos de ratón C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}

Se realizaron infecciones en ratones silvestres y ratones KO *Il17a*^{-/-} con la cepa H99. Los ratones fueron sacrificados tras 6 y 9 días de infección. Se seleccionaron estos tiempos y no 7 y 14 días, como en experimentos anteriores, porque los ratones KO resultaron ser muy sensibles a la infección por *C. neoformans* y mostraban síntomas de enfermedad a tiempos cortos. Transcurrido este tiempo, se analizó la morfología de las levaduras en el pulmón (figura 4.41).

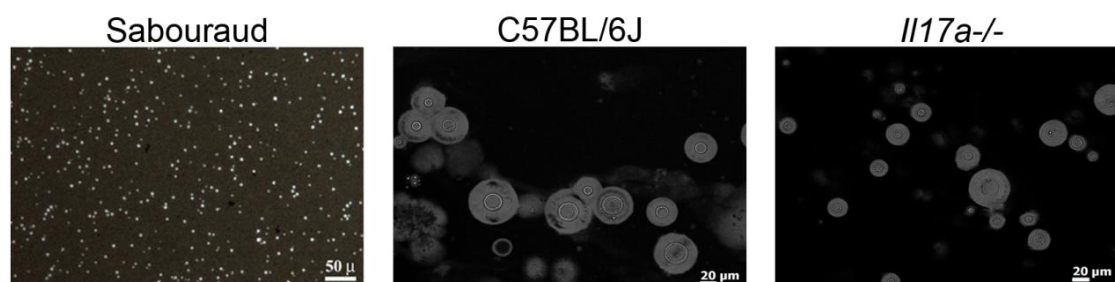


Figura 4.41. Morfología de *C. neoformans* en ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Células de *C. neoformans* H99 (10^6 células/ratón) fueron inoculadas en ratones macho C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} tal y como se indica en Material y métodos. Tras 9 días de infección, se aislaron y homogeneizaron los pulmones. El tamaño de las levaduras se visualizó tras suspender los extractos en tinta china. En la figura también se muestra el tamaño de las levaduras que crecieron *in vitro* en medio Sabouraud.

Se midieron alrededor de 400 células por grupo. Como se observa en la figura 4.42, a los 9 días de infección se observaron células gigantes en ambas cepas de ratón. Sin embargo, en la cepa silvestre, el tamaño celular medio de *C. neoformans* fue alrededor de 50 micras, mientras que en los ratones *Il17a*^{-/-} se observó una menor proporción de estas células y el tamaño medio de las mismas era entre 35-40 micras. La media de tamaño de las células observadas en los pulmones de los ratones KO fue significativamente menor en comparación con los ratones silvestres ($p < 0.0001$).

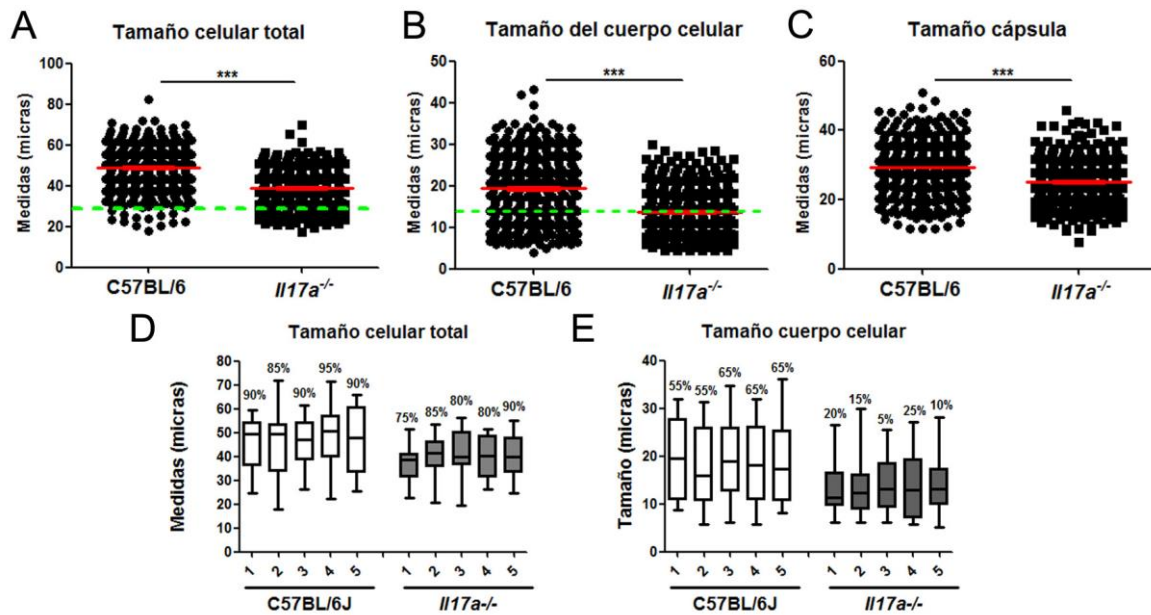


Figura 4.42. Tamaño de *C. neoformans* en ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Distribución del tamaño celular total (A), tamaño del cuerpo celular (B) y tamaño de la cápsula (C) de células de *C. neoformans* H99 aisladas del pulmón de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} después de 9 días de infección con una dosis de 10⁶ células/ratón. Las líneas rojas representan la media y el error estándar. Las líneas verdes indican la medida a partir de la cual se consideran células gigantes. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución del tamaño celular total. La línea dentro de la caja representa la mediana y las líneas superior e inferior representan el percentil 75 y 25 respectivamente. Los números encima de cada distribución indican el porcentaje de células gigantes encontradas en cada animal. (D) tamaño celular total y (E) tamaño del cuerpo celular obtenido en 5 ratones de cada cepa.

Al analizar el tamaño celular total, encontramos que la proporción de células gigantes (>30 µm) era alrededor de 95 % en los ratones silvestres, mientras que en los ratones *Il17a*^{-/-} era del 83 % (figura 4.43A).

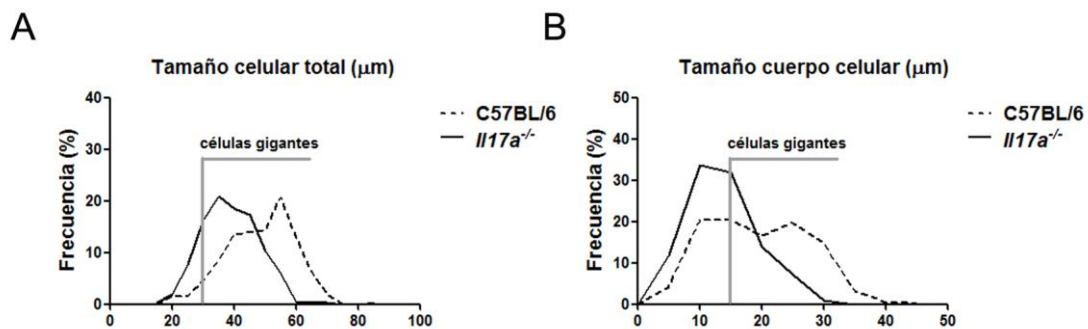


Figura 4.43. Distribución de tamaño de *C. neoformans* en ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Representación de la frecuencia del tamaño celular total (A) y del tamaño del cuerpo celular (B) de células de *C. neoformans* WT H99 aisladas de ratones C57BL/6J (línea de puntos) y de ratones *Il17a*^{-/-} (línea negra) tras 9 días de infección con una dosis de 10⁶ células/ratón.

Sin embargo, cuando se analizó la frecuencia de células con un cuerpo celular mayor de 15 μm , encontramos que en los ratones silvestres el porcentaje era del 62.5 % comparado con un 34,75 % en los ratones deficientes para la IL-17 (figura 4.43B). Los datos obtenidos muestran que los ratones *Il17a*^{-/-} hay un porcentaje más bajo de células gigantes en comparación con los animales silvestres.

4.4.2.2 Análisis del peso de los órganos diana durante la infección de *C. neoformans*

Cuando calculamos el índice organosomático, observamos que los pulmones aumentaron significativamente de tamaño tras la infección en ambas cepas de ratón en comparación con los pulmones de ratones no infectados (figura 4.44). Con respecto al cerebro, en ambos casos hubo un aumento de tamaño en los ratones infectados, aunque fue más acusado en los ratones KO. En el caso del bazo, y al contrario que en el cerebro, la cepa silvestre C57BL/6J aumentó de forma significativa el tamaño de este órgano en los ratones infectados en comparación con la cepa *Il17a*^{-/-}.

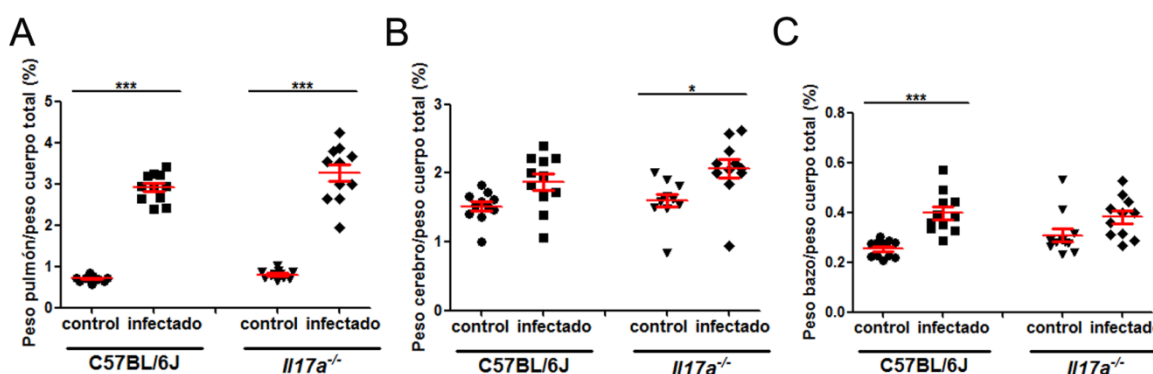


Figura 4.44. Efecto de *C. neoformans* sobre el tamaño de órganos diana en animales C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Peso de los pulmones, cerebros y bazos con respecto al peso total del ratón en ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} tras 9 días de infección con la cepa H99 de *C. neoformans*.

4.4.2.3 Histopatología de los pulmones infectados

Tras 9 días de infección, se podía apreciar macroscópicamente la formación de granulomas en ambas cepas de ratón. Para investigar el tipo de respuesta inflamatoria y el reclutamiento celular en los pulmones, realizamos un análisis histopatológico. Como se puede observar en la figura 4.45, hubo una gran infiltración celular tras la infección.

Además, se visualizaron con facilidad las células gigantes en las fotografías tomadas con mayor aumento. Estas células fueron fácilmente identificadas por su forma redondeada y por el halo blanco que corresponde a la cápsula de *C. neoformans*. Las células gigantes se encontraron con mayor frecuencia en la cepa silvestre C57BL/6J en comparación con los secciones de los pulmones de ratones *Il17a*^{-/-}.

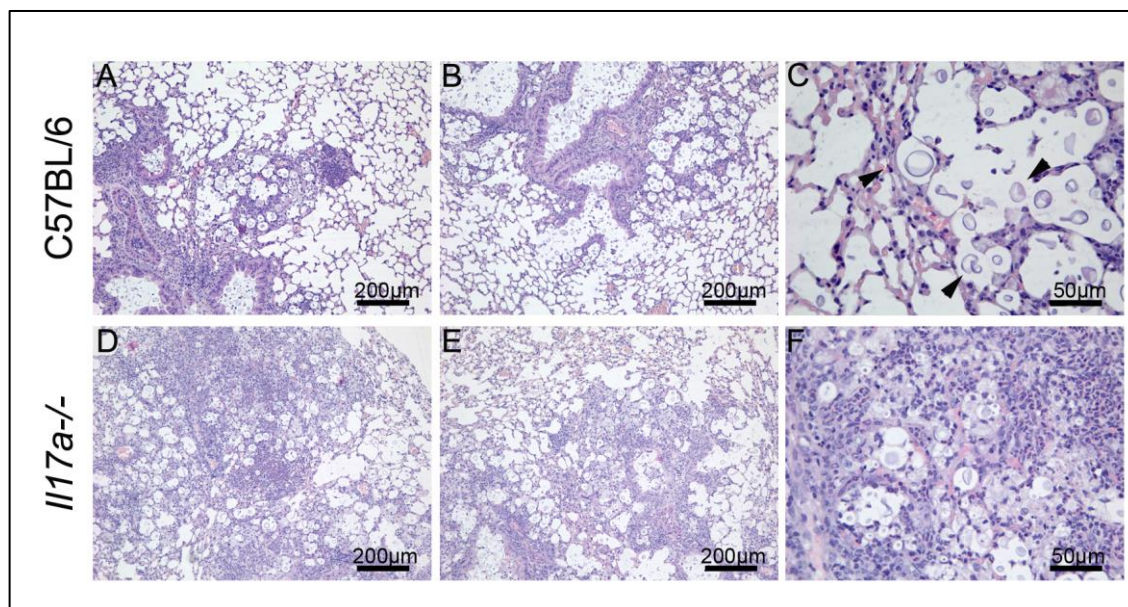


Figura 4.45. Histología de pulmones de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} infectados con *C. neoformans*. Las imágenes muestran secciones de pulmones de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} teñidas con hematoxilina/eosina. Ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} fueron infectados con la cepa 10⁶ levaduras de la cepa H99 por ratón. Tras 9 días de infección, se extrajeron los pulmones y se realizaron cortes histológicos. Las imágenes A, B, D y E están tomadas a baja magnificación mientras que las imágenes C y F con alta magnificación. Las flechas negras de la imagen C indican células gigantes de *C. neoformans*.

4.4.2.4 Correlación de la morfología de *C. neoformans* con la diseminación al sistema nervioso central

Seguidamente, estudiamos si había una correlación entre la morfología de *C. neoformans* y la diseminación al SNC. Para ello, tras 6 y 9 días de infección, se extrajeron los pulmones y los cerebros de los ratones, se homogeneizaron en PBS y se determinó el número de UFCs. Como se observa en la figura 4.46A/B, no se obtuvieron diferencias significativas en el pulmón. Por otra parte, el recuento de UFCs en el cerebro fue significativamente más alto en los ratones *Il17a*^{-/-} en comparación con los ratones silvestres después de 6 días de infección (figura 4.46C), mientras que esta diferencia no se observó a los 9 días (figura 4.46D). Estos resultados sugieren que en los ratones deficientes para la citoquina IL-17 la diseminación de *C. neoformans* al SNC se produce antes que en los ratones silvestres C57BL/6J.

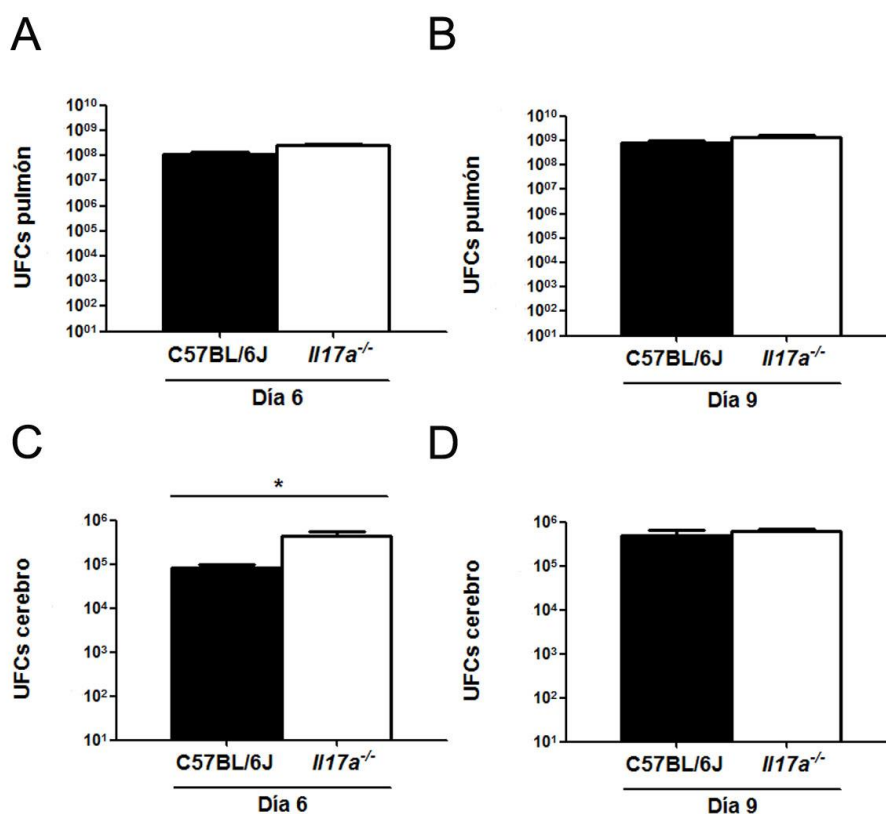


Figura 4.46. Carga fúngica y diseminación de *C. neoformans* en ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Ratones C57BL/6J (barras negras) e *Il17a*^{-/-} (barras blancas) infectados como se describe en la figura 4.45 fueron sacrificados tras 6 (A y C) y 9 (B y D) días de infección, y el número de UFCs se cuantificó en pulmones (A y B) y cerebros (C y D). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas.

4.4.3 Estudio de la respuesta inmune durante la infección de *C. neoformans* en ratones *Il17a*^{-/-}

A continuación decidimos investigar el patrón de citoquinas acumulado tanto en el pulmón como en el cerebro y el reclutamiento celular en ambos órganos.

4.4.3.1 Análisis de la producción de citoquinas durante la infección

Para identificar el tipo de respuesta inmune inducido en cada cepa de ratón, decidimos medir las siguientes citoquinas; Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-12), Th2 (IL-14 e IL-10) y Th17 (IL-17, IL-21, IL-22, IL-23). En esta ocasión, se evaluaron citoquinas que no se midieron anteriormente en el apartado 4.4.1.4. Se incluyeron en el análisis más citoquinas del tipo de respuesta Th17, como IL-21, IL-22 e IL-23 (que han sido asociadas con respuestas autoinmunes y antitumorales) y la IL-1 β (la cual es producida principalmente por macrófagos activos y células dendríticas en respuesta al TNF- α).

4.4.3.1.1 Citoquinas en el pulmón

Como se muestra en la figura 4.47, se observaron diferencias en la concentración de citoquinas en el pulmón de ambas cepas de ratón.

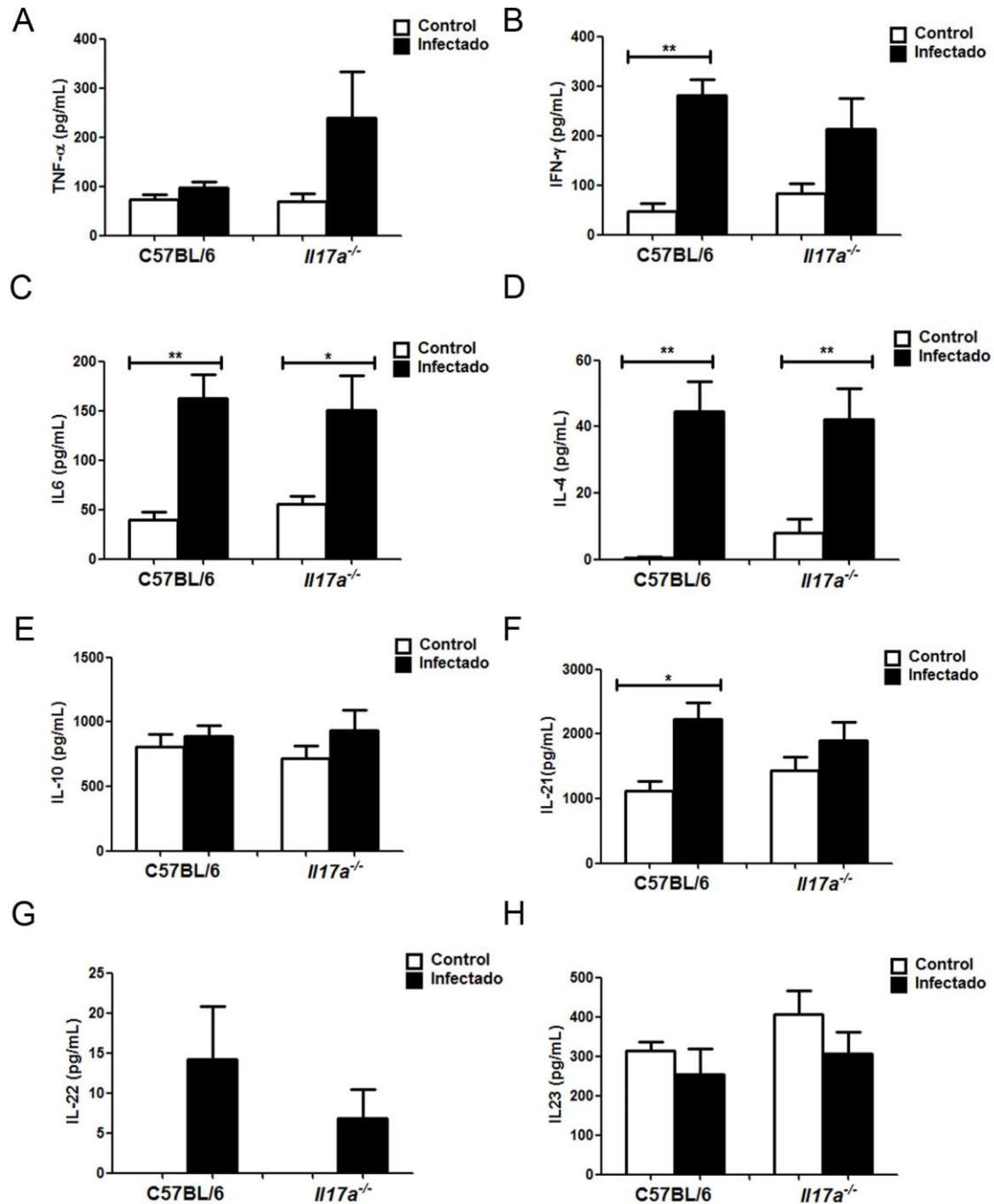


Figura 4.47. Concentración de citoquinas en el pulmón de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-} fueron infectados con 10⁶ levaduras de la cepa H99 por ratón (barras negras), o tratados con PBS (barras blancas). La concentración de TNF-α (A), IFN-γ (B), IL-6 (C), IL-4 (D), IL-10 (E), IL-12 (F), IL-22 (G) e IL-23 (H) fue determinada de los extractos de pulmón después de 9 días de infección, tal y como se indica en Material y métodos. En la figura se representa la media y la desviación estándar de 5 ratones diferentes. Los asteriscos indican diferencia significativa entre ratones control e infectados.

En lo que respecta a las citoquinas del tipo de respuesta Th1, la infección por *C. neoformans* indujo una mayor acumulación de TNF- α en los ratones *Il17a*^{-/-} en comparación con los animales silvestres, lo que sugiere que en ausencia de IL-17, se produce una respuesta compensatoria que acumula algunas citoquinas de tipo Th1. El IFN- γ aumentó de forma significativa en los ratones silvestres infectados, pero este aumento no fue significativo en los animales KO. En el resto citoquinas de tipo Th1 analizadas no se obtuvieron diferencias. Las citoquinas IL-4 e IL-10 (Th2) aumentaron en respuesta a *C. neoformans* de igual manera en ambas cepas de ratón, lo cual confirma que los ratones C57BL/6J tienen una respuesta polarizada a tipo Th2. Por último, en las citoquinas del tipo de respuesta Th17, se produjo un aumento significativo de IL-21 durante la infección en los ratones C57BL/6J que no se observó en los ratones *Il17a*^{-/-}. La citoquina IL-22, aumentó de manera similar en los animales silvestres e *Il17a*^{-/-}. Por último, la IL-17 aumentó en ratones silvestres infectados, y como era de esperar, no fue detectada en los ratones *Il17a*^{-/-}.

4.4.3.1.2 Citoquinas en el cerebro

También medimos la concentración de todas estas citoquinas en el cerebro de los ratones tras 9 días de infección. Como se muestra en la figura 4.48, la producción de todas las citoquinas analizadas aumentó en los cerebros de los ratones *Il17a*^{-/-}. La concentración de las citoquinas TNF- α e IFN- γ (Th1) fue mayor en los animales infectados ($p < 0,05$) en comparación con los controles (sin infección) y este aumento fue mucho más marcado en los ratones *Il17a*^{-/-} que en los ratones silvestres C57BL/6J (infectados). La concentración de IL-10 (Th2) también fue más alta en el cerebro de ratones *Il17a*^{-/-} infectados con respecto a los controles ($p < 0,05$). En lo que concierne a las citoquinas Th17, todas estaban más aumentadas en los ratones *Il17a*^{-/-} que en los ratones silvestres, pero solo la IL-21 y la IL-22 aumentaron de forma significativa con respecto al control ($p < 0,05$). Las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-4 no se acumularon en los cerebros de ninguna de las dos cepas de ratón (datos no mostrados).

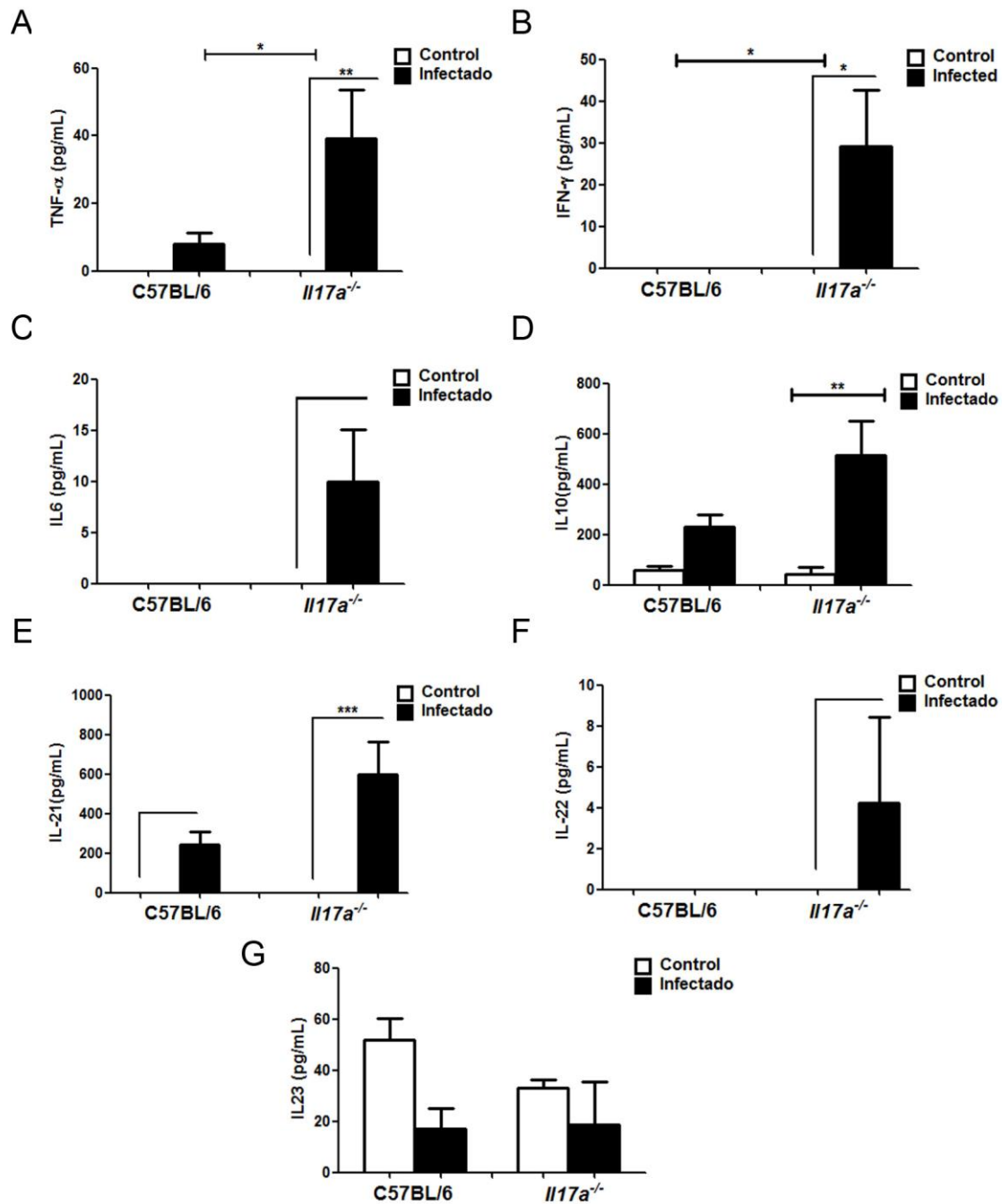


Figura 4.48. Concentración de citoquinas en el cerebro de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Los ratones fueron infectados como se indica en la figura 4.47 y la concentración de TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-21 (E), IL-22 (F) e IL-23 (G) fue determinada de los extractos de cerebro después de 9 días de infección. En la figura se representa la media y la desviación estándar de 5 ratones diferentes. Los asteriscos indican diferencia significativa entre ratones control e infectados.

4.4.3.1.3 Reclutamiento celular en pulmones y cerebro

Para cuantificar el reclutamiento celular en los pulmones y en el cerebro, medimos la cantidad de linfocitos, macrófagos y células polimorfonucleares (PMNs) mediante citometría de flujo (ver Material y métodos) en ratones de ambas cepas después de 9

días de infección. Como se observa en la figura 4.49, la infección por *C. neoformans* produjo cambios en la proporción de células inmunes en el pulmón. En los ratones C57BL/6J infectados, la proporción de linfocitos, macrófagos y PMNs fue significativamente mayor que los ratones control (sin infectar) y los ratones *Il17a*^{-/-}.

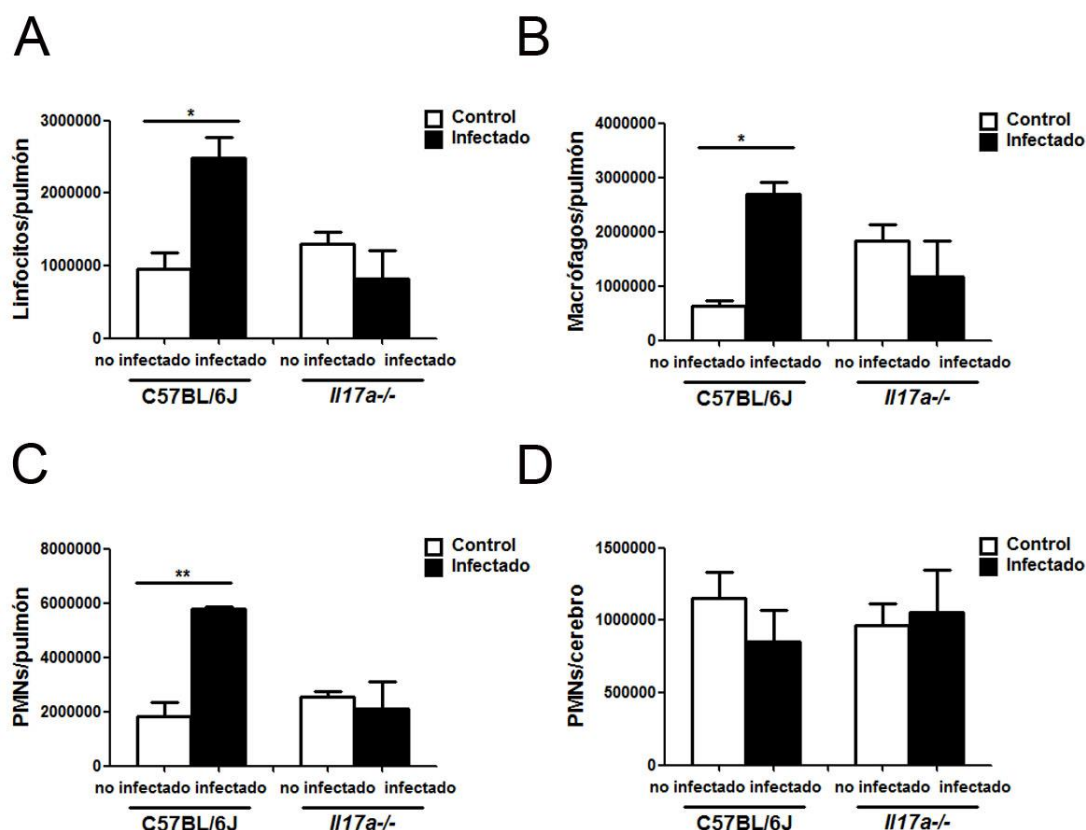


Figura 4.49. Reclutamiento de células inmunes en los pulmones y cerebros de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. Los animales fueron infectados como se describe en la figura 4.47, y tras 9 días se extrajeron los pulmones (A, B y C) y cerebros (D). Dichos órganos se homogeneizaron tal y como se describe en material y métodos, y se cuantificó el número total de linfocitos (A), macrófagos (B), y PMNs (C y D).

En lo que respecta al cerebro, no se observaron diferencias significativas en la proporción de PMNs entre los ratones infectados de ambas cepas de ratón, aunque esta proporción fue ligeramente más alta en los ratones *Il17a*^{-/-} en comparación con los ratones control.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

La infección por hongos patógenos es un proceso multifactorial en el que intervienen tanto factores del huésped como del microorganismo. Clásicamente, la investigación de este tipo de infecciones se ha centrado en la caracterización de factores de virulencia que causan daño en el huésped, como enzimas líticas y mecanismos de invasión y diseminación. Sin embargo, la adaptación al huésped y la evasión del sistema inmune es también vital para poder proliferar y sobrevivir. Los cambios morfológicos, como la formación de hifas, participan en la virulencia de varias maneras, ya que favorecen la captación de nutrientes, la adhesión e invasión de los tejidos, evasión de la fagocitosis y les confiere ventajas durante la infección. Además, la deficiencia en estas transiciones morfológicas altera la biología de estos patógenos.

Sin embargo, el concepto de morfogénesis en *C. neoformans* y *C. gattii* es distinto, ya que durante la infección no aparecen filamentos, sino que las células cambian de tamaño. Estos cambios pueden producirse mediante el crecimiento capsular, o formación de células gigantes donde aumenta el tamaño tanto de la cápsula como del cuerpo celular (Feldmesser *et al.*, 2001; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Estos cambios son muy característicos de la infección por este patógeno, por lo que en este trabajo nos hemos propuesto estudiar la morfogénesis de *C. neoformans* en profundidad.

5.1 Síntesis de cápsula y crecimiento capsular

La cápsula de polisacárido es el principal rasgo fenotípico de *C. neoformans*, y su principal factor de virulencia (Zaragoza *et al.*, 2009). Además, no es una estructura estática, sino que puede cambiar de estructura y tamaño en el huésped (Feldmesser *et al.*, 2001). Sin embargo, los mecanismos que regulan la síntesis y crecimiento de la cápsula son desconocidos. Se ha propuesto que el polisacárido capsular se sintetiza intracelularmente y que después es transportado al exterior de la célula dentro de vesículas (Rodrigues *et al.*, 2007). En una primera parte del trabajo, hemos estudiado la dinámica de aparición y ensamblaje de la cápsula en una cepa que expresa el gen *pGAL7::CAP59* que solo sintetiza la cápsula en presencia de galactosa (Chang *et al.*, 1995). En células silvestres, la cápsula ya es visible en la célula hija en los primeros estadios de la gemación (Zaragoza *et al.*, 2006), apareciendo en el polo opuesto a la célula madre y extendiéndose al mismo tiempo que la célula hija va aumentando de tamaño, de manera que tiene cápsula completa en el momento de la separación. Este resultado sugiere que la síntesis de la cápsula ocurre de manera polarizada a partir de un punto determinado. Usando esta cepa, hemos observado que la cápsula aparece en

puntos distribuidos homogéneamente por toda la célula. Esto indica que la síntesis de la cápsula no es dirigida desde un punto en concreto de la pared celular sino que ocurre de forma dispersa y no polarizada. La síntesis de la cápsula se ha relacionado con la producción de vesículas extracelulares (Rodrigues *et al.*, 2007). Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, ya que la secreción de vesículas se observa en microscopía electrónica de transmisión a través de toda la célula y de forma no polarizada. Creemos que este es un modelo interesante para investigar los cambios asociados a la síntesis capsular, como producción y contenido de vesículas, cambios intracelulares y cambios en la pared entre otros.

El tamaño de la capsula no es constante, y el crecimiento capsular es una de las principales características fenotípicas durante la infección. Este fenómeno supone un cambio drástico para la célula, ya que se ha estimado que durante este proceso se acumula aproximadamente un 20 % de polisacárido nuevo en la cápsula en unas pocas horas (Maxson *et al.*, 2007b). Por ello, se cree que es un proceso muy costoso energéticamente. Este hecho es especialmente llamativo, porque el crecimiento capsular ocurre en condiciones limitantes de nutrientes, lo cual puede indicar que tiene una gran importancia para la biología de *C. neoformans*. Para conocer hasta qué punto el crecimiento de la cápsula es dependiente de energía, hemos evaluado el efecto de diferentes inhibidores de la cadena respiratoria durante la inducción de la cápsula.

En los eucariotas, la energía requerida para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la respuesta a estrés deriva principalmente de la producción de ATP durante la respiración mitocondrial. Se ha postulado que esta necesidad de energía es muy importante para la capacidad de los microorganismos de producir enfermedad. En los animales, la transferencia de electrones durante la respiración desde el NADH hasta el oxígeno ocurre a través de los complejos de la membrana interna mitocondrial. Además de esta vía clásica, las plantas superiores (Moore and Siedow, 1991), las algas (Dinant *et al.*, 2001), los hongos (Sakajo *et al.*, 1993; Kirimura *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003) y las amebas (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998) poseen otras vías de transferencia de electrones (Alonso-Monge *et al.*, 2009), que incluyen la ruta alternativa de la NADPH deshidrogenasa insensible a rotenona (Kerscher, 2000) y la ruta de la oxidasa alternativa (AOX). Se ha visto que *C. albicans* contiene una tercera ruta respiratoria llamada PAR (ruta respiratoria paralela) (Ruy *et al.*, 2006).

Para estudiar la función mitocondrial en el aumento capsular, se bloquearon los diferentes complejos de la cadena transportadora de electrones con inhibidores de la fosforilación oxidativa (figura 5.1). Previsiblemente, el bloqueo de la cadena de electrones

puede producir efectos drásticos en la célula, por lo que solo se utilizaron inhibidores que no causaron muerte celular.

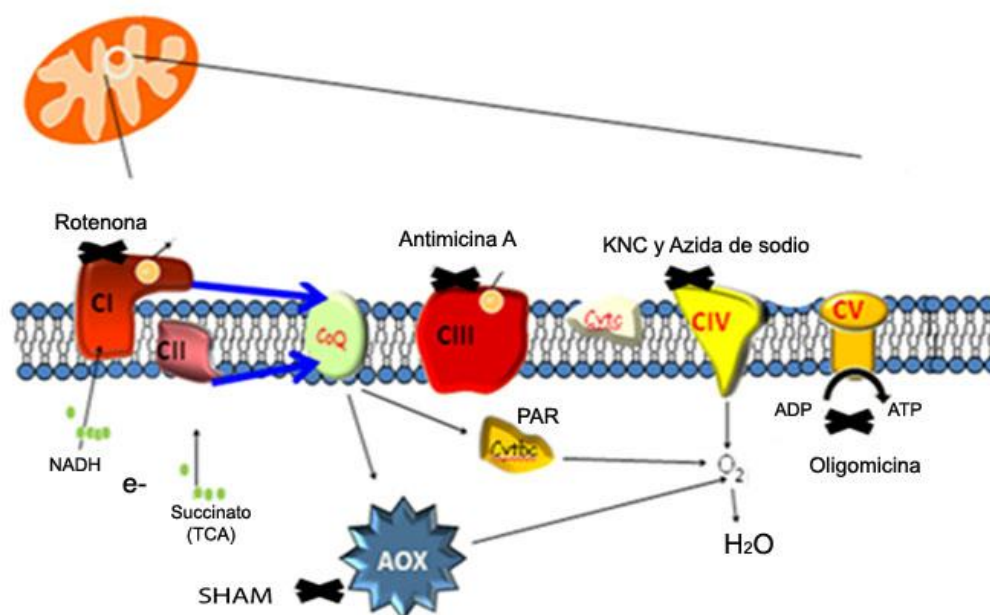


Figura 5.1. Representación esquemática de la cadena transportadora de electrones y los inhibidores mitocondriales utilizados para bloquear los distintos complejos.

Nuestros resultados muestran que es necesario el correcto funcionamiento de todos los complejos de la cadena transportadora de electrones para que tenga lugar la inducción de la cápsula de *C. neoformans*. Es interesante el hecho de que al bloquear una de las rutas, como la AOX, es suficiente para inhibir el crecimiento capsular. Este resultado sugiere que en condiciones limitantes de nutrientes, una parte importante de la energía celular se invierte en la síntesis de la cápsula. No se puede descartar que una limitación en la producción de ATP influya también en la replicación del ADN, con lo que las células en estas circunstancias podrían responder parando el ciclo en la fase G₀. Además, observamos que durante el crecimiento de la cápsula hay cambios en el potencial de membrana mitocondrial, lo que indica que en estas condiciones hay una mayor actividad mitocondrial que resulta en mayor secreción de protones al espacio periplásmico. Como el complejo oxidasa alternativa no está presente en mamíferos, creemos que esta ruta podría ser una buena diana antifúngica. Consideramos que nuestros resultados deben ser confirmados en el futuro con diferentes abordajes, como

medida de la respiración o de la actividad de enzimas mitocondriales durante el crecimiento capsular.

La cápsula es el principal factor de virulencia de *C. neoformans*, ya que mutantes acapsulares son avirulentos (Chang and Kwon-Chung, 1994; Chang *et al.*, 1996; Chang and Kwon-Chung, 1998; Chang and Kwon-Chung, 1999). Sin embargo, no se conoce en detalle hasta qué punto células con diferente tamaño de cápsula tienen diferente virulencia. En este trabajo, hemos utilizado un mutante descrito en la literatura, *gat201*, que sintetiza cápsula, pero tiene afectada la inducción.

Al analizar la virulencia de este mutante en *G. mellonella*, observamos que las larvas infectadas con el mutante mostraban mayor supervivencia que las infectadas con la cepa silvestre, aunque ambas cepas crecieron de igual manera tanto a 30 como a 37 °C. Estos resultados sugieren que el crecimiento de la cápsula es importante para la virulencia de *C. neoformans*. Por otra parte, las células fagocíticas juegan un papel muy importante en la respuesta inmune del huésped frente a *C. neoformans*, y la habilidad de este patógeno para evadir la fagocitosis es crucial para la patogénesis (Del Poeta, 2004). Estos resultados muestran que la fagocitosis del mutante *gat201* fue alrededor de un 60 % mientras que en la cepa silvestre H99 fue entorno al 30 %. Las propiedades antifagocíticas de *C. neoformans* han sido atribuidas a la cápsula de polisacárido (Del Poeta, 2004). Nuestros resultados concuerdan con los publicados en otros trabajos, ya que al tener afectada la inducción de la cápsula, el mutante *gat201* tiene defectos para evadir la fagocitosis. De hecho, este mutante es fagocitado más eficientemente por macrófagos de ratón (Liu *et al.*, 2008). Sin embargo, no podemos descartar que este mutante pueda estar alterado en más fenotipos necesarios para la virulencia. De hecho, se ha visto que *gat201* también regula las síntesis de melanina (Liu *et al.*, 2008). Por ello, se requieren más estudios para verificar el papel del crecimiento capsular en la virulencia.

5.2 Obtención de células gigantes en condiciones *in vitro*

El otro cambio característico de *C. neoformans* es la formación de células gigantes (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). A pesar del cambio drástico que supone la aparición de este tipo de células, su función en la virulencia y los mecanismos que regulan su formación no son conocidos. Una de las grandes limitaciones para investigar las células gigantes es la dificultad de reproducir este fenómeno *in vitro*. Se ha descrito que estas células aparecen en presencia de fosfolípidos (Chrisman *et al.*, 2011). En este trabajo hemos definido un medio de cultivo en el que hemos conseguido reproducir parcialmente este fenómeno y que hemos definido como medio TCM (de las siglas *Titan Cells Medium*). Este medio tiene varias características: limitación de

nutrientes, pH neutro y suero de mamífero. Las células gigantes observadas en modelos *in vivo* pueden llegar a alcanzar hasta las 70-100 micras (Feldmesser *et al.*, 2001; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Zaragoza and Nielsen, 2013). En nuestro caso, el tamaño de las células gigantes es menor, lo cual puede ser debido a que estamos observando el proceso inicial de esta transición. Sin embargo, en el medio TCM, las células alcanzan un tamaño cercano a 30 micras en unas horas. Existen varias razones por las que las células no alcanzan el mismo tamaño en el medio TCM que en los animales. Es posible que en el medio de cultivo se agoten los nutrientes o el factor inductor que favorece este cambio morfológico. En cambio, las infecciones *in vivo* se mantienen durante más tiempo, con una concentración de nutrientes estable, por lo que las células tienen mayor oportunidad de alcanzar tamaños significativamente mayores. Tampoco se puede descartar que *in vivo* haya otros factores inductores no presentes en nuestro medio *in vitro*.

5.2.1 Factores del medio TCM que favorecen las células gigantes

Se ha descrito que el suero de mamíferos, y en concreto, la fracción de lípidos polares, induce el crecimiento capsular en *C. neoformans* (Zaragoza *et al.*, 2003a; Chrisman *et al.*, 2011). Nuestros resultados demuestran que en determinadas situaciones, el suero también induce el crecimiento del cuerpo celular, y de hecho, es el principal factor necesario para la formación de células gigantes en el medio TCM. Sin embargo, el suero no es suficiente para inducir este proceso, y su efecto depende de varios factores, como la limitación de nutrientes y la concentración celular. Hemos determinado que los fosfolípidos del suero son el principal factor que induce la formación de células gigantes. Esto está de acuerdo con trabajos previos en los que se observó que la exposición prologanda (6-8 días) de *C. neoformans* a fosfolípidos del suero resulta en la aparición de células gigantes (Chrisman *et al.*, 2011). Sin embargo, la función del suero durante la formación de células gigantes *in vivo* es discutible, ya que las levaduras solo se encuentran en este fluido cuando cruzan los endotelios y penetran al torrente sanguíneo. En cambio, las células gigantes se forman principalmente en los espacios alveolares, donde no hay suero, excepto en condiciones de edema agudo. Por ello, pensamos que el agente inductor fisiológico debe ser otro componente del pulmón. Este órgano está continuamente expuesto a diferentes microorganismos, por lo que la respuesta inmune innata del pulmón es muy efectiva y específica de este órgano, e incluye macrófagos alveolares, lisozima y surfactante pulmonar (Martin and Frevert, 2005). El surfactante pulmonar es producido por los neumocitos de tipo II y está compuesto en un 80 % por fosfolípidos. Su principal función es reducir la tensión superficial alveolar, ya que es un agente tensoactivo que en contacto con el agua

modifica su tensión superficial. Además, algunas proteínas del surfactante son antimicrobianas y pueden actuar como opsoninas. Por todo ello, planteamos la hipótesis de que la unión del surfactante a *C. neoformas* pueda ser una de las señales que induzca el crecimiento celular.

La señalización intracelular en respuesta a los fosfolípidos durante la inducción de células gigantes no es conocida. Una posibilidad es que los fosfolípidos sean degradados por la fosfolipasa C, que produce diacilglicerol (DG), o la fosfolipasa B, que produce ácido araquidónico (AA) (Noverr *et al.*, 2003). El DG es un activador de la proteína kinasa C (Pkc) de humanos, y también es capaz de activar la de *S. cerevisiae* en presencia de fosfatidilcolina (Ogita *et al.*, 1990). Por otra parte, AA también es un potente activador de la Pkc de levaduras (Ogita *et al.*, 1990; Antonsson *et al.*, 1994). Esta proteína participa en múltiples procesos, como regulación e integridad de la pared celular (Heinisch *et al.*, 1999; Kamada *et al.*, 1995; Davenport *et al.*, 1995) y crecimiento polarizado (Zarrov *et al.*, 1996).

El suero solo tiene efecto en condiciones limitantes de nutrientes, ya que en medios ricos no indujo el crecimiento celular. Este hecho sugiere que la formación de células gigantes es una respuesta a estrés. La concentración de nutrientes en el medio y la fuente de carbono inducen múltiples cambios en la célula. Por ejemplo, altas concentraciones de glucosa inducen represión catabólica de genes necesarios para la utilización de otras fuentes de carbono (ver revisiones en (Gancedo, 1998; Kayikci and Nielsen, 2015). Por otra parte, la limitación de nutrientes también activa la ruta TOR (de las siglas en inglés *Target of Rapamycin*) (Heitman *et al.*, 1991), que es una quinasa altamente conservada que regula el crecimiento y la división celular y que responde a cambios en el ambiente como la disponibilidad de nutrientes o el estado energético celular (Otsubo and Yamamoto, 2008). En los últimos años, se ha demostrado que la vía TOR controla diferentes procesos, todos ellos relacionados con el crecimiento celular, organización de actina, tráfico de membrana, degradación de proteínas y señalización a través de la Pkc entre otros (Schmelzle and Hall, 2000). La PKC tiene un papel central en la regulación de múltiples procesos celulares incluyendo el crecimiento celular y la proliferación, y se ha demostrado que la ruta TOR regula positivamente la fosforilación de PKC (Ziegler *et al.*, 1999).

Otro de los factores que hemos determinado que es importante para la formación de células gigantes *in vitro* es el CO₂. La cápsula se induce en respuesta a concentraciones de CO₂ presentes en el huésped (Granger *et al.*, 1985), lo cual es consistente con que este factor también favorece el crecimiento del cuerpo celular. El

CO₂ se convierte en HCO₃⁻ por medio de las anhidrasas carbónicas. En *C. neoformans*, hay dos genes, *CAN1* y *CAN2*, que codifican esta enzima, siendo Can2 la mayoritaria (Mogensen *et al.*, 2006). El bicarbonato activa a la adenilato ciclasa (Bahn *et al.*, 2005; Mogensen *et al.*, 2006), por lo que nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que el CO₂ induce el crecimiento celular a través de la ruta del AMPc.

Uno de los resultados más llamativos de esta parte del trabajo es el efecto de la densidad celular en la formación de células gigantes. Este proceso no fue observado con concentraciones elevadas de células, lo que sugiere que está regulado por fenómenos de *quórum sensing*, el cual es un sistema de comunicación célula-célula mediado por moléculas liberadas al medio por las células. De esta manera, una mayor densidad celular resulta en una mayor concentración de las moléculas liberadas y mayor efecto sobre las células (Atkinson and Williams, 2009; Nealson *et al.*, 1970; Waters and Bassler, 2005). Existen varias moléculas involucradas en este proceso, siendo el farnesol una de las más caracterizadas, principalmente en *C. albicans*. El farnesol es un alcohol sesquiterpeno que se encuentra en extractos de plantas y también en diferentes hongos, y fue descrito como la primera molécula responsable de fenómenos de QS (Hornby *et al.*, 2001). En el caso de los hongos, el efecto del farnesol se ha investigado con mayor profundidad en *C. albicans*, donde se ha visto que esta molécula inhibe la transición de levaduras a hifas (Hornby *et al.*, 2001). En *C. neoformans*, se ha visto que el farnesol inhibe su crecimiento *in vitro* y que tiene efecto sobre la secreción de fosfolipasas y proteasas (Cordeiro Rde *et al.*, 2012), enzimas asociadas a la virulencia. Otro trabajo demuestra que el QS regula la formación de biofilms, la liberación de GXM y la síntesis de melanina en este patógeno (Albuquerque *et al.*, 2014). En nuestras condiciones, el farnesol inhibió la formación de células gigantes, lo cual es consistente con el efecto observado sobre la formación de hifas en *C. albicans*. Por el momento, desconocemos el mecanismo por el cual el QS y el farnesol inhiben el crecimiento celular. Sin embargo, se ha descrito que esta molécula inhibe la adenilato ciclasa en *C. albicans* (Lindsay *et al.*, 2012), lo que es consistente con inhibición de formación de células gigantes. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la proporción de células gigantes en ratones infectados con bajas dosis de inóculo fue significativamente mayor que en aquellos infectados con dosis más altas (Zaragoza *et al.*, 2010).

Un factor que también favoreció el crecimiento celular fue una concentración subinhibitoria de azida de sodio, la cual inhibe la respiración mitocondrial. El efecto de la azida fue aditivo, ya que aumentó el efecto de otros factores. Por ello, pensamos que una inhibición parcial de la cadena respiratoria puede desencadenar una señal de estrés que

resulte en una parada del ciclo celular, y de esta manera, permitir un mayor aumento celular.

El crecimiento celular ocurre principalmente en la fase G1 del ciclo celular, y antes de progresar a la fase S y G2, las células necesitan alcanzar un tamaño determinado. Además, existe una relación constante entre la masa celular y su contenido de ADN (Aldea *et al.*, 2007; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Grebien *et al.*, 2005), de manera que células de tamaño anormalmente grande son poliploides. Las células gigantes de *C. neoformans* aisladas de pulmones son poliploides (Zaragoza *et al.*, 2010; Okagaki *et al.*, 2010; Gerstein *et al.*, 2015), por lo que se piensa que estas células se forman por endorreduplicación. Este proceso supone una alteración del ciclo celular, en el que tras la fase G2, las células omiten la mitosis, y vuelven a entrar en G1, lo que produce células que en cada ciclo aumentan su tamaño y contenido de ADN.

En nuestras condiciones, hasta la fecha no hemos conseguido medir el contenido de ADN de las células gigantes, ya que parecen ser impermeables a los colorantes como yoduro de propidio o DAPI. Además, hemos observado con frecuencia que durante la manipulación y fijación necesaria para la permeabilización, las células gigantes parecen lisarse y perder el contenido intracelular, lo que puede explicar la falta de tinción del núcleo (figura 5.2).

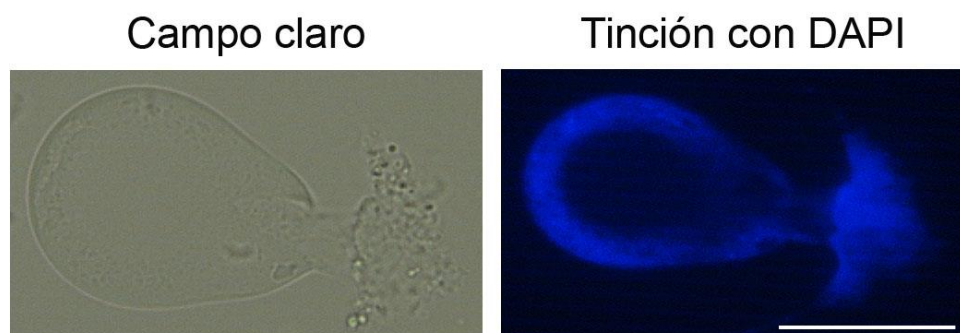


Figura 5.2. Imágenes de células gigantes de la cepa H99 obtenidas *in vitro* en medio TCM sin tinción (panel izquierdo) y teñidas con colorante DAPI (panel derecho). La barra de escala corresponde a 10 micras.

De cualquier manera, pensamos que los factores que inducen las células gigantes *in vitro*, como el suero, CO₂ y el farnesol, actúan alterando el ciclo celular (ver figura 5.3), produciendo una parada en G1 y varias rondas de endorreduplicación. Sin embargo, esta

hipótesis debe ser todavía confirmada analizando en detalle el contenido de ADN de estas células.

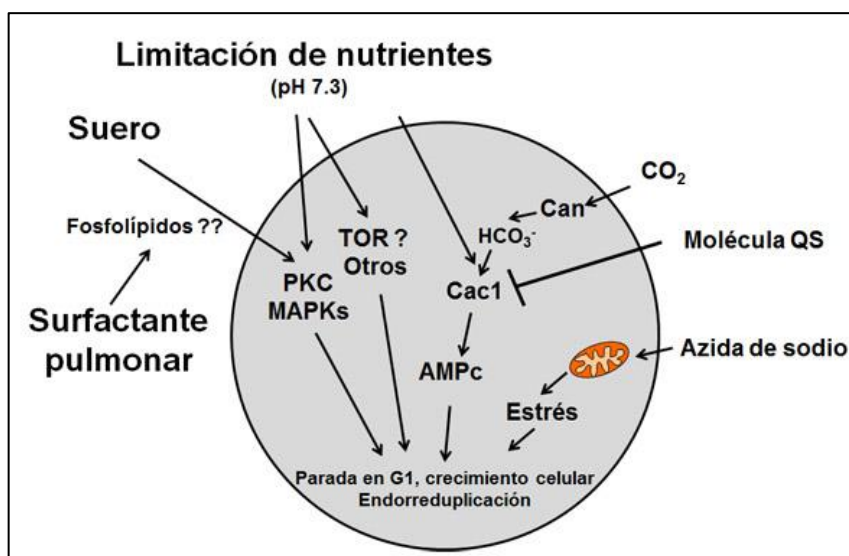


Figura 5.3. Representación esquemática de la integración de los diferentes factores del medio TCM y de las rutas intracelulares que podrían activar o reprimir durante la formación de células gigantes.

5.2.2 Otros factores que influyen en la inducción de células gigantes

La formación de células gigantes ha sido observada en muestras clínicas (Love *et al.*, 1985; Cruickshank *et al.*, 1973; Wang *et al.*, 2014), y a pesar de ser un mecanismo que confiere ventajas a *C. neoformans* frente al huésped durante la infección, hemos observado que este proceso no es un fenotipo universal. Nuestros resultados muestran que existe una gran variabilidad entre diferentes aislados en lo que respecta a la capacidad de formar células gigantes. No obstante, las cepas de *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) son las que más proporción de células gigantes formaron, lo que sugiere que este serotipo tiene mayor capacidad de adaptación al pulmón. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que es el serotipo que se aísla con mayor frecuencia en pacientes infectados (Heitman *et al.*, 2011), lo que sugiere que hay una correlación entre capacidad de formar células gigantes y desarrollo de la enfermedad. Por ello, creemos que esta correlación debería ser confirmada en futuros ensayos clínicos.

Hasta el momento, no sabemos las diferencias genéticas que contribuyen a la variabilidad en la capacidad de formación de células gigantes. Es posible que diferentes cepas regulen de manera distinta la ruta del AMPc, aunque también puede existir variabilidad en otros reguladores. Por ejemplo, en este trabajo hemos encontrado nuevas rutas que parecen estar involucradas en la regulación del crecimiento celular, como es el

caso del gen *CAR1* (CNAG_02500), que codifica la calnexina. Mutantes sin esta proteína tuvieron un tamaño anormalmente grande, incluso en medios ricos. La calnexina es una chaperona que retiene glicoproteínas no plegadas correctamente en el retículo endoplasmático. El mutante *gtl1*, que codifica una UDP-glucosa glucosiltransferasa y que participa en la glicosilación de proteínas, presentó un fenotipo similar. Por el momento desconocemos la razón de este fenotipo, pero pensamos que en ausencia de estas proteínas, hay un defecto en el control de la calidad en el plegamiento y modificaciones postraduccionales de las proteínas, que posiblemente repercute produciendo una parada del ciclo celular y consiguiente aumento de tamaño. Sin embargo, también es posible que este defecto produzca un fallo en la secreción de proteínas, que podrían acumularse de manera masiva en el retículo y causar con ello un aumento en el tamaño de las células.

En resumen, en este trabajo se han identificado nuevos factores y proteínas que influyen en el tamaño celular, y cuyo papel en la biología de las células gigantes será investigado en el futuro.

5.3 Expresión de genes durante la formación de células gigantes

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) ha revolucionado al análisis genómico y transcriptómico, permitiendo el estudio de la expresión génica con un gran nivel de profundidad. La secuenciación masiva del ARN (RNAseq) es una herramienta potente para la visualización de la complejidad del transcriptoma, que permite identificar las secuencias codificantes de todo el genoma, estructura de genes, splicing alternativo y el ARN no codificante (Wang, 2009). En este trabajo hemos utilizado la técnica del RNAseq para identificar los genes que se expresan de forma diferente en dos condiciones de cultivo distintas (células pequeñas en medio Sabouraud y células gigantes en medio TCM). Los resultados obtenidos de este análisis mostraron un total de 410 genes que están sobreexpresados en las células gigantes en condiciones *in vitro*. Hemos identificado el gen *CIG1*, que codifica una manoproteína involucrada en la captación de hierro, como uno de los genes que más expresado está en estas condiciones. La unión y el secuestro de hierro es uno de los mecanismos que el huésped utiliza en la protección frente a diversos patógenos (Hwang *et al.*, 2008; Jung and Kronstad, 2011; Vartivarian *et al.*, 1993). Para adaptarse a la limitación de hierro, *C. neoformans* desarrolla diferentes respuestas, como un aumento en su transporte activo (Vartivarian *et al.*, 1993) o un incremento en el tamaño de la cápsula. Nuestros resultados sugieren que la formación de células gigantes puede ser inducida por condiciones limitantes de este metal. En este sentido, se ha descrito que la respuesta a

niveles de hierro pueda estar mediada por la ruta del AMPc (Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 1998; D'Souza *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2007).

Por otra parte, entre los genes que aparecen reprimidos en estas células, hemos identificado *PCL1*, que codifica una ciclina que regula el paso G1/S del ciclo celular. Este resultado sugiere que en nuestras condiciones hay un retraso en la transición de la fase G1 a S, por lo que el incremento de tamaño se debería principalmente a la elongación de la fase G1. Por ello, planteamos la hipótesis de que la formación de células gigantes requiere varios procesos, como elongación de la fase G1 y endorreproducción.

Además, también detectamos que en las células gigantes había un aumento de la expresión de un gran número de genes involucrados en procesos metabólicos. Esto puede ser debido a que las células de tamaño normal se obtuvieron tras incubarlo en un medio rico mientras que las células gigantes crecieron en un medio con limitación de nutrientes. Sin embargo, creemos lógico pensar que el estrés producido por la limitación de nutrientes que existe en el pulmón pueda contribuir a la inducción de células gigantes, que adaptarían su metabolismo para optimizar su utilización. En este sentido, también es llamativo que entre los genes sobreexpresados, haya una gran cantidad que codifican transportadores transmembrana y componentes integrales de membrana. Este resultado sugiere y apoya la idea de que estas células optimizan la captación de nutrientes del exterior.

Para averiguar diferencias entre genes de las células gigantes que se inducen por medio de cultivo utilizado o al propio proceso de formación de células gigantes, nos hemos propuesto comparar la expresión en condiciones en las que tanto las células gigantes como las células de menor tamaño sean aisladas del mismo medio. Para ello, pretendemos obtener las células en medio TCM a una concentración de 10^4 células/mL, y compararlas con células incubadas en las mismas condiciones pero a una concentración de 10^6 células/mL, que son condiciones en las que no aparecen este tipo de células. Además, estos nuevos experimentos se realizarán en presencia de CO₂, por lo que esperamos definir de manera más detallada los genes involucrados en este cambio morfológico.

También hemos estudiado la expresión génica durante la formación de células gigantes en condiciones *in vivo* utilizando un modelo animal. Este abordaje paralelo tiene la ventaja de que las poblaciones de estudio han sido aisladas del mismo ambiente y sometidas a las mismas condiciones. Una limitación de nuestro estudio es que el número de lecturas de ARN obtenidas *in vivo* fue menor que en el análisis realizado *in vitro*, ya que se obtuvieron muchas lecturas correspondientes al ADN del ratón pese a la

purificación a la fueron sometidas ambas poblaciones celulares. Aunque no sabemos cual es la explicación, pensamos que el ADN que se libera durante la lisis de las células del ratón pueda adherirse al polisacárido de la cápsula, el cual puede purificarse junto con el ARN. A pesar de ser una limitación técnica, creemos que este fenómeno debería investigarse en detalle en el futuro, ya que sugiere un mecanismo por el cual el polisacárido capsular podría unirse al ADN del huésped y quizás alterar su funcionalidad. Aun así, obtuvimos un total de 916 genes sobreexpresados en las células gigantes, de los que cabe destacar el que codifica una metaloproteínasa elastinolítica extracelular. Muchos microorganismos utilizan las hidrolasas extracelulares para obtener nutrientes de polímeros que están en el ambiente y además han sido relacionadas en procesos de colonización y virulencia en distintos patógenos (Hase and Finkelstein, 1993; Hube *et al.*, 1994; Kwon-Chung *et al.*, 1985; Parmely, 1992). Nuestro análisis también sugiere que estas células parecen sintetizar proteínas de manera muy activa, ya que se obtuvieron un gran número de genes involucrados en procesos intracelulares, traducción, relacionados con ribosoma y con la mitocondria.

Por otra parte, se compararon los perfiles de expresión génica obtenidos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados revelan un total de 80 genes sobreexpresados en las células gigantes que coinciden en ambos análisis y un total de 21 genes reprimidos. Al centrarnos en los genes sobreexpresados, hemos identificado muchos genes que codifican proteínas que están relacionadas con el Acetil CoA. El Acetil CoA es una molécula intermediaria clave en el metabolismo. Se ha visto que durante la infección pulmonar, *C. neoformans* induce la expresión de genes implicados en el ciclo del glioxilato, gluconeogénesis, β -oxidación, biosíntesis de aminoácidos y producción y utilización de Acetil CoA (Hu *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2012), lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. Los factores que influyen en el Acetil CoA son de particular interés por la posición central que ocupa este metabolito en las rutas de utilización de glucosa y otras fuentes de carbono (figura 5.4). Además, mutantes de la Acetil-CoA sintasa son menos virulentos durante la infección (Hu *et al.*, 2008). Nuestros resultados por lo tanto sugieren que la inducción de células gigantes conlleva un cambio metabólico que le confiere una ventaja selectiva para utilizar de manera eficiente las fuentes de carbono disponibles en el medio, así como las que obtiene mediante degradación de componentes celulares, como lípidos o proteínas. Se ha sugerido que el Acetil CoA también puede tener importancia en otros aspectos durante la infección, ya que es un precursor de la síntesis de quitina en la pared celular y necesario para la O-acetilación de la cápsula (Rodrigues *et al.*, 2008a). Esta acetilación juega un papel importante en la inhibición de la migración de neutrófilos (Ellerbroek *et al.*, 2004). En este análisis, también se obtuvieron genes involucrados en transporte, ciclo celular y de resistencia a múltiples

drogas. Estos datos pueden resultar de gran interés para buscar nuevas dianas antifúngicas o marcadores de células gigantes.

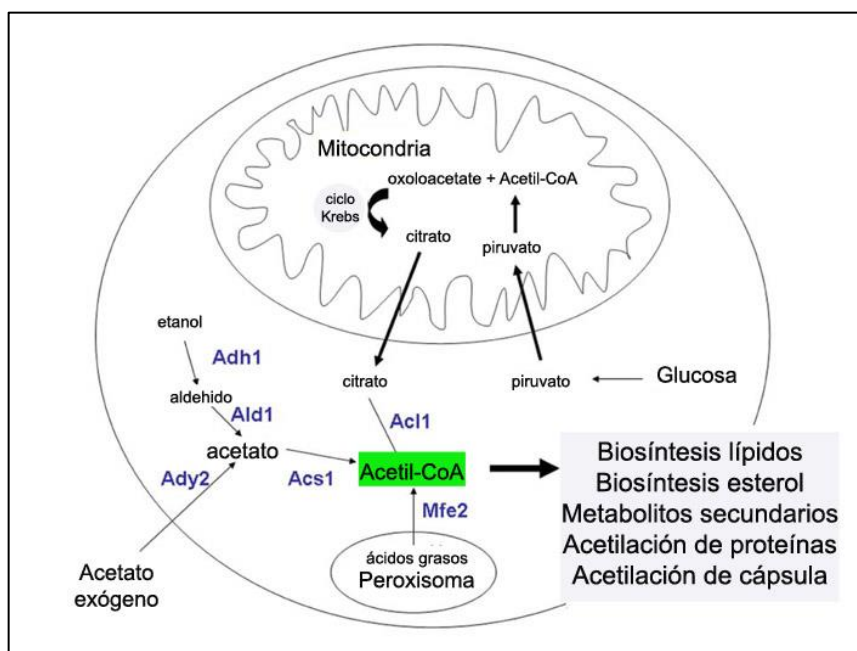


Figura 5.4. Esquema representativo de las fuentes de Acetil-CoA citoplasmático y papel del Acetil-CoA en el metabolismo y otros procesos. Figura modificada de Griffiths *et al.*, 2012.

5.4 Influencia del huésped en la formación de células gigantes

En otra parte del trabajo, investigamos como el ambiente del huésped influye en la formación de células gigantes de *C. neoformans*. En un primer abordaje, hemos estudiado la formación de células gigantes en dos cepas de ratón diferentes. Nuestros resultados mostraron que la proporción de células gigantes es mayor en ratones C57BL/6J que en ratones CD1. Debido a que estas células no son fagocitadas por su gran tamaño y que son resistentes a factores de estrés, nuestros resultados pueden ayudar a predecir la susceptibilidad del huésped a la infección o la eficacia del tratamiento. Para identificar los factores del huésped que influyen en este cambio morfológico, hemos intentado correlacionar la morfología de las levaduras con diferentes parámetros de la enfermedad y de la respuesta inmune del ratón.

En primer lugar, se realizaron curvas de supervivencia en ambas cepas de ratón para intentar correlacionar la morfología de las levaduras con la susceptibilidad del huésped a la infección. Observamos que los ratones C57BL/6J fueron más sensibles a la infección por *C. neoformans* que los CD1. Estos datos se correlacionan con la mayor

proporción de células gigantes observadas en el pulmón de estos ratones. Además, la diseminación al cerebro fue mayor en los ratones C57BL/6J, lo cual es consistente con su mayor sensibilidad a la infección y a que desarrollan una respuesta inmune menos eficaz que los ratones CD1. Sin embargo, a priori hubiera sido esperado que en aquellos ratones en los que hay una mayor diseminación al cerebro hubiera una menor proporción de células gigantes en el pulmón. Nuestros resultados indican que pueden encontrarse situaciones en las que no existe dicha correlación por varias razones. En primer lugar, las células gigantes pueden contribuir a la diseminación al producir células hijas de menor tamaño (Garcia-Rodas *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 2010). Además, el número de levaduras en el pulmón es muy alto, y la proporción de células de tamaño normal puede diseminarse y proliferar en el cerebro si el sistema inmune no induce una respuesta eficaz.

A continuación, medimos diferentes parámetros que indican la severidad de la infección por *C. neoformans*, como el aumento de tamaño de los pulmones o el bazo, cambios en la producción de anticuerpos y la respuesta de citoquinas. En ambas cepas de ratón se observó que los pulmones infectados estaban inflamados y con presencia de granulomas. Pero los ratones C57BL/6J incrementaron el tamaño de los pulmones de forma más significativa que los ratones CD1, aunque el número de UFCs fue similar en ambas cepas de ratón. Creemos que esta diferencia se debe a que la mayor proporción de células gigantes en este órgano ocupa un volumen significativamente mayor que las células de menor tamaño. También puede ser que en estos ratones haya un mayor reclutamiento de células inmunes. Con respecto al tamaño del bazo, los ratones CD1 presentaron mayor aumento en el tamaño de este órgano en comparación con los ratones C57BL/6J. La principal función del bazo es la producción de células sanguíneas nuevas y mantener una reserva de sangre (Janeway *et al.*, 2005). Además, la esplenomegalia está considerada como una respuesta a la infección. Esto sugiere que los ratones CD1 tienen mayor actividad del bazo y responden de manera más efectiva a la infección que los C57BL/6J, lo cual se correlaciona con la menor diseminación y mayor control de la enfermedad.

El patrón de citoquinas acumulado en el pulmón indica que los ratones C57BL/6J produjeron niveles muy bajos de IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, estos ratones acumularon la citoquina IL-4 de forma significativa a ambos tiempos en comparación con los ratones CD1. Estos resultados indican que la formación de células gigantes se correlaciona con respuestas de tipo Th2. Se ha descrito que los ratones C57BL/6J desarrollan una respuesta inmune de tipo Th2 durante la infección (Guillot *et al.*, 2008; Hoag *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2008; Milam *et al.*, 2007). Este tipo de respuesta inmune está asociada con menor protección frente a la infección por *C. neoformans*, donde una respuesta efectiva

requiere la producción de citoquinas del tipo de respuesta Th1, que es la que desarrollaron los ratones CD1 (Hoag *et al.*, 1997; Decken *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2013; Huffnagle and McNeil, 1999; Zaragoza *et al.*, 2007). Otros parámetros que indican que los ratones C57BL/6J desarrollan una respuesta de tipo Th2 fue la mayor producción de anticuerpos medida en estos animales, que generalmente se considera una respuesta no protectora frente a *C. neoformans*. Además, este microorganismo inhibe la producción de anticuerpos *in vivo* (Casadevall and Scharff, 1991; Deshaw and Pirofski, 1995; Diamond and Bennett, 1974). Sin embargo, los anticuerpos pueden jugar un papel importante en la respuesta a *C. neoformans*, ya que se ha descrito que la administración de Abs monoclonales que reconocen la cápsula puede conferir protección o empeorar la enfermedad (Maitta *et al.*, 2004; Taborda *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2002; Beenhouwer *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1992). Nuestros datos apoyan la hipótesis de que un aumento en la producción de Abs resulta en una mayor predisposición a sufrir infección (Subramaniam *et al.*, 2010a) y que un incremento de IgM en suero refleja un tipo de respuesta inmune de tipo Th2. Por otra parte, también se ha sugerido que los niveles de IgM pueden predecir el riesgo de sufrir criptococosis (Subramaniam *et al.*, 2009). Además, también medimos la concentración en suero de IgE, la cual se acumuló de manera significativa en los ratones C57BL/6J durante la infección. Los niveles de IgE están asociados a respuestas alérgicas y polarización hacia inmunidad de tipo Th2. Hay estudios que han demostrado que *C. neoformans* causa en los ratones C57BL/6J una infección pulmonar crónica acompañada de una respuesta alérgica de tipo Th2 (Huffnagle and McNeil, 1999), lo cual es consistente con los mayores niveles de IgE que hemos detectado en este trabajo. Sin embargo, nuestros resultados también están en contra de que en nuestras condiciones se produzca una infección crónica, ya que los ratones C57BL/6J fueron muy sensibles a la infección. Creemos que esto se debe a que en nuestras condiciones hemos utilizado la cepa H99, que es muy virulenta. Sin embargo, en los trabajos que muestran infección crónica en los ratones C57BL/6J, se usó la cepa 24067, que es de serotipo D y menos virulenta.

Los resultados obtenidos sugieren que el tipo de respuesta inmune del huésped influye en la formación de células gigantes de *C. neoformans* y nos permiten plantear la siguiente hipótesis. Un tipo de respuesta Th1 confiere protección frente a la infección y controla el crecimiento de las levaduras de forma más eficiente. Puede ser que este tipo de respuesta produzca mayor concentración de moléculas antifúngicas en el pulmón, siendo más difícil para las levaduras aumentar su tamaño celular. En cambio, un tipo de respuesta Th2 es menos protectora y resultaría en un ambiente en el pulmón menos agresivo para las levaduras, que podrían incrementar su tamaño significativamente. Sin embargo, no podemos descartar que algunos de los factores descritos anteriormente,

como la concentración de fosfolípidos o de CO₂, sean diferentes por razones desconocidas en estos dos tipos de animales, lo que también podría explicar las diferencias encontradas.

Nuestros resultados tienen importantes implicaciones clínicas para determinar la susceptibilidad de los pacientes a la infección. La identificación de factores del huésped que pueden afectar a la formación de células gigantes puede ayudar a predecir si un paciente en particular presenta una mayor predisposición a sufrir criptococosis. El mayor factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad es una disminución de linfocitos CD4, aunque también se han descrito otros factores, como bajos niveles de IgM en suero (Subramaniam *et al.*, 2010b). Nuestro trabajo, también tiene implicaciones en la eficacia del tratamiento antifúngico de los pacientes diagnosticados, ya que las células gigantes son más resistentes a factores de estrés (Zaragoza *et al.*, 2010), por lo que una alta proporción de células gigantes puede correlacionarse con fallo terapéutico. Por ello, creemos que los datos presentados pueden contribuir al diseño de futuras estrategias basadas en la medicina individualizada y ayudar a mejorar el resultado del tratamiento antifúngico.

5.4.1 Papel de la IL-17 en la morfogénesis de *C. neoformans*

Para profundizar en los factores del sistema inmune que regulan la formación de células gigantes, nuestro grupo está llevando a cabo diferentes abordajes, basados en la modulación del sistema inmune y uso de ratones KO. Durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Anna Vecchiarelli, hemos podido investigar el papel de la IL-17 en la morfogénesis de *C. neoformans* usando ratones que no producen esta citoquina (Nakae *et al.*, 2002). La IL-17 estimula principalmente macrófagos y células endoteliales para producir factores que contribuyen a la inflamación local, y ha sido descrita como un mediador clave durante la defensa del huésped contra infecciones fúngicas (Conti *et al.*, 2009; Marais *et al.*, 2016; McAleer and Kolls, 2014; Aggarwal and Gurney, 2002; Kolls and Linden, 2004). Al comparar la morfología de las levaduras recuperadas del pulmón de ratones C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}, observamos que el tamaño celular medio de las levaduras fue significativamente menor en los ratones que no producen IL-17. Estos resultados fueron en principio inesperados, ya que los ratones *Il17a*^{-/-} son deficientes en respuesta inflamatoria, pero confirman que la ausencia de IL-17 tiene un efecto en la morfología de *C. neoformans*.

Cuando se analizó el aumento de tamaño de los órganos diana, se observó inflamación en los pulmones en ambas cepas de ratón, lo cual se correlaciona con el número de UFCs observadas en este órgano a los dos tiempos evaluados (6 y 9 días).

Por otra parte, los ratones *Il17a*^{-/-} aumentaron más el tamaño del cerebro, pero el número de UFCs era similar en ambas cepas tras 9 días de infección. Sin embargo, al evaluar las UFCs en este órgano a un tiempo más corto (6 días) se encontraron diferencias significativas entre los C57BL/6J e *Il17a*^{-/-}. La mayor diseminación en los ratones *Il17a*^{-/-} se correlacionó en este caso con una menor proporción de células gigantes en el pulmón. Hay estudios que demuestran que la IL-17A es crucial en la prevención de la diseminación de *C. albicans* (Mosci *et al.*, 2014). Otros estudios también han relacionado a la citoquina IL-23 en la defensa contra la infección crónica por *C. neoformans* (Kleinschek *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la IL-23 refuerza la producción de IL-17 (Rutitzky *et al.*, 2008).

Además, ratones carentes de IL-23 o IL-17 muestran una respuesta inmune celular disminuida (Nakae *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2005). En general, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la citoquina IL-17 es importante para impedir que las levaduras escapen del pulmón y diseminen al cerebro, aunque el tamaño de las levaduras en el pulmón es menor que en ratones silvestres.

Para entender el mecanismo por el que la citoquina IL-17 regula el crecimiento de las levaduras y la diseminación en el ratón, medimos el perfil de citoquinas acumuladas en cerebro y pulmón. Encontramos que aunque el número de UFCs en el cerebro tras 9 días de infección fue similar en ratones KO y silvestres, había diferencias significativas en las citoquinas acumuladas. Los resultados obtenidos confirman que los ratones C57BL/6J tienen una respuesta de tipo Th2. Curiosamente, en los ratones *Il17a*^{-/-} se detectaron altos niveles de TNF- α que no se observaron en los ratones silvestres. Esto puede significar que estos animales tratan de compensar la falta de IL-17 produciendo otras citoquinas del tipo de respuesta Th1, lo cual concuerda con que las levaduras en el pulmón de estos ratones tienen un tamaño menor. Sin embargo, nuestro trabajo presenta la limitación de que existe una variación en el tamaño de las levaduras en los ratones C57BL/6J usados en diferentes laboratorios. El tamaño celular medio de las células gigantes de los ratones C57BL/6J utilizados en Italia fue alrededor de unas 50 μ m, mientras que las células gigantes observadas en los ratones C57BL/6J utilizados en nuestras instalaciones en el Centro Nacional de Microbiología eran de unas 30-35 μ m. Esta discrepancia puede ser debida a que el origen de los ratones es distinto, los tiempos de infección y condiciones de mantenimiento en ambas instituciones son diferentes. Por ello, y para evitar estas diferencias interlaboratorio, creemos que estos resultados deben ser confirmados con diferentes abordajes, como inhibición de la IL-17 *in vivo* usando anticuerpos anti-IL-17, o administración de TNF- α a los ratones C57BL/6J para potenciar su respuesta de tipo Th1.

Discusión

Como resumen, los resultados de esta tesis doctoral proporcionan un mayor conocimiento de los mecanismos que regulan la morfogénesis de *C. neoformans* *in vitro* e *in vivo*. Creemos que nuestro trabajo contribuirá a entender los mecanismos de virulencia de esta levadura y ayudar a predecir la susceptibilidad de pacientes a sufrir criptococosis y a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- 6.1 La síntesis de la cápsula de *C. neoformans* ocurre de manera homogénea y no polarizada.
- 6.2 El aumento del tamaño de la cápsula requiere del correcto funcionamiento de la mitocondria.
- 6.3 La formación de células gigantes de *C. neoformans* puede inducirse parcialmente *in vitro* en presencia de suero de mamífero en medios limitantes en nutrientes.
- 6.4 La formación de células gigantes requiere la presencia de cápsula, y está regulada por fenómenos de *quorum sensing*.
- 6.5 Las células gigantes de *C. neoformans* sobreexpresan genes que codifican proteínas de membrana, metabólicas y relacionadas con el acetil-CoA, lo que indica que estas células inducen cambios metabólicos que le permiten adaptarse a las condiciones del huésped.
- 6.6 La formación de células gigantes *in vivo* se correlaciona con una respuesta inmune de tipo Th2.

7. REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

- Aggarwal, S., and Gurney, A.L.** (2002) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* **71**: 1-8.
- Ajello, L.** (1971) Sexual reproduction among fungi pathogenic to man. A historical review. *Mykosen* **7**: 343-352.
- Albuquerque, P., Nicola, A.M., Nieves, E., Paes, H.C., Williamson, P.R., Silva-Pereira, I., and Casadevall, A.** (2014) Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* **5**: e00986-00913.
- Alcouloumre, M.S., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Selsted, M.E., and Edwards, J.E., Jr.** (1993) Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 2628-2632.
- Aldea, M., Gari, E., and Colomina, N.** (2007) Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* **6**: 2599-2603.
- Almirante, B., Rodriguez, D., Park, B.J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A.M., Almela, M., et al.** (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**: 1829-1835.
- Alonso-Monge, R., Carvaihlo, S., Nombela, C., Rial, E., and Pla, J.** (2009) The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **155**: 413-423.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., and Heitman, J.** (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **11**: 3206-3217.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., and Heitman, J.** (1998) Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* **25**: 1-14.
- Alspaugh, J.A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L.M., Funnell, D., Cox, G.M., et al.** (2002) Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **1**: 75-84.
- Alvarez, M., and Casadevall, A.** (2006) Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* **16**: 2161-2165.
- Alvarez, M., and Casadevall, A.** (2007) Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol* **8**: 16.
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., Castaneda, E., Lazera, M., Velegraki, A., et al.** (2012) Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia* **173**: 337-346.

Referencias

- Andama, A.O., den Boon, S., Meya, D., Cattamanchi, A., Worodria, W., Davis, J.L., et al.** (2013) Prevalence and outcomes of cryptococcal antigenemia in HIV-seropositive patients hospitalized for suspected tuberculosis in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* **63**: 189-194.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M.A., and Paravicini, G.** (1994) Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J Biol Chem* **269**: 16821-16828.
- Arora, S., Hernandez, Y., Erb-Downward, J.R., McDonald, R.A., Toews, G.B., and Huffnagle, G.B.** (2005) Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *J Immunol* **174**: 6346-6356.
- Atkinson, S., and Williams, P.** (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* **6**: 959-978.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., et al.** (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**: 275-281.
- Bahn, Y.S., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Heitman, J.** (2005) Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr Biol* **15**: 2013-2020.
- Bar-Peled, M., Griffith, C.L., and Doering, T.L.** (2001) Functional cloning and characterization of a UDP- glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12003-12008.
- Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G., and Ryley, J.F.** (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* **131**: 1217-1221.
- Baum, G.L., and Artis, D.** (1961) Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cell free human serum. *Am J Med Sci* **241**: 613-616.
- Beenhouwer, D.O., Shapiro, S., Feldmesser, M., Casadevall, A., and Scharff, M.D.** (2001) Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **69**: 6445-6455.
- Benham, R.W.** (1935) Cryptococci: their identification by morphology and by serology. *J. Infect. Dis.* **57**: 255-274.
- Bergman, A., and Casadevall, A.** (2010) Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. *MBio* **1**.
- Bitar, D., Lortholary, O., Le Strat, Y., Nicolau, J., Coignard, B., Tattevin, P., et al.** (2014) Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis* **20**: 1149-1155.
- Borst, A., Raimer, M.T., Warnock, D.W., Morrison, C.J., and Arthington-Skaggs, B.A.** (2005) Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 783-787.

- Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., Diaz, M.R., Spanjaard, L., Dromer, F., et al.** (2006) Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* **6**: 599-607.
- Brown, A.J., Brown, G.D., Netea, M.G., and Gow, N.A.** (2014) Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol* **22**: 614-622.
- Brunke, S., Seider, K., Fischer, D., Jacobsen, I.D., Kasper, L., Jablonowski, N., et al.** (2014) One small step for a yeast--microevolution within macrophages renders *Candida glabrata* hypervirulent due to a single point mutation. *PLoS Pathog* **10**: e1004478.
- Buchanan, K.L., and Doyle, H.A.** (2000) Requirement for CD4(+) T lymphocytes in host resistance against *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of immunized mice. *Infect Immun* **68**: 456-462.
- Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R.** (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**: 21-30.
- Casadevall, A.** (1998) Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol* **6**: 102-107.
- Casadevall, A., Mukherjee, J., and Scharff, M.D.** (1992) Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods* **154**: 27-35.
- Casadevall, A., Nosanchuk, J.D., Williamson, P., and Rodrigues, M.L.** (2009) Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* **17**: 158-162.
- Casadevall, A., and Perfect, J.** (1998) *Cryptococcus neoformans*, p. 541. Washington DC: ASM.
- Casadevall, A., and Pirofski, L.A.** (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**: 17-24.
- Casadevall, A., and Pirofski, L.A.** (2015) What is a host? Incorporating the microbiota into the damage-response framework. *Infect Immun* **83**: 2-7.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., and Nosanchuk, J.D.** (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 354-358.
- Casadevall, A., and Scharff, M.D.** (1991) The mouse antibody response to infection with *Cryptococcus neoformans*: VH and VL usage in polysaccharide binding antibodies. *J Exp Med* **174**: 151-160.
- Cassone, A., De Bernardis, F., Mondello, F., Ceddia, T., and Agatensi, L.** (1987) Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* **156**: 777-783.
- Ceesay, M.M., Sadique, Z., Harris, R., Ehrlich, A., Adams, E.J., and Pagliuca, A.** (2015) Prospective evaluation of the cost of diagnosis and treatment of invasive fungal disease in a cohort of adult haematology patients in the UK. *J Antimicrob Chemother* **70**: 1175-1181.
- Cleare, W., and Casadevall, A.** (1998) The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A

Referencias

- and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**: 125-129.
- Coenjaerts, F.E., Hoepelman, A.I., Scharringa, J., Aarts, M., Ellerbroek, P.M., Bevaart, L., et al.** (2006) The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *FEMS Yeast Res* **6**: 652-661.
- Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., et al.** (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* **206**: 299-311.
- Cooney, N.M., and Klein, B.S.** (2008) Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. *Curr Opin Microbiol* **11**: 511-516.
- Cordeiro Rde, A., Nogueira, G.C., Brilhante, R.S., Teixeira, C.E., Mourao, C.I., Castelo-Branco Dde, S., et al.** (2012) Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. *Vet Microbiol* **159**: 375-380.
- Cordero, R.J., Frases, S., Guimaraes, A.J., Rivera, J., and Casadevall, A.** (2011) Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity. *Mol Microbiol* **79**: 1101-1117.
- Crabtree, J.N., Okagaki, L.H., Wiesner, D.L., Strain, A.K., Nielsen, J.N., and Nielsen, K.** (2012) Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **80**: 3776-3785.
- Crowley, M., Inaba, K., and Steinman, R.M.** (1990) Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* **172**: 383-386.
- Cruickshank, J.G., Cavill, R., and Jelbert, M.** (1973) *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* **25**: 309-312.
- Cutler, J.E., and Poor, A.H.** (1981) Effect of mouse phagocytes on *Candida albicans* in in vivo chambers. *Infect Immun* **31**: 1110-1116.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J.** (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* **14**: 4912-4919.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J.** (1998) Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **66**: 2230-2236.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J.** (1999) Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* **181**: 5636-5643.
- Chang, Y.C., Penoyer, L.A., and Kwon-Chung, K.J.** (1996) The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun* **64**: 1977-1983.

- Chang, Y.C., Stins, M.F., McCaffery, M.J., Miller, G.F., Pare, D.R., Dam, T., et al.** (2004) Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun* **72**: 4985-4995.
- Chang, Y.C., Wickes, B.L., and Kwon-Chung, K.J.** (1995) Further analysis of the *CAP59* locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. *Gene* **167**: 179-183.
- Charlier, C., Chretien, F., Baudrimont, M., Mordelet, E., Lortholary, O., and Dromer, F.** (2005) Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* **166**: 421-432.
- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., and Dromer, F.** (2009) Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 120-127.
- Chen, G.H., McNamara, D.A., Hernandez, Y., Huffnagle, G.B., Toews, G.B., and Olszewski, M.A.** (2008) Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infect Immun* **76**: 2379-2391.
- Cherniak, R., Jones, R.G., and Reiss, E.** (1988) Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr Res* **172**: 113-138.
- Cherniak, R., Morris, L.C., Anderson, B.C., and Meyer, S.A.** (1991) Facilitated isolation, purification, and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **59**: 59-64.
- Cherniak, R., and Sundstrom, J.B.** (1994) Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **62**: 1507-1512.
- Chottanapund, S., Singhasivanon, P., Kaewkungwal, J., Chamroonswasdi, K., and Manosuthi, W.** (2007) Survival time of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. *J Med Assoc Thai* **90**: 2104-2111.
- Chrisman, C.J., Albuquerque, P., Guimaraes, A.J., Nieves, E., and Casadevall, A.** (2011) Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog* **7**: e1002047.
- D'Souza, C.A., Alspaugh, J.A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Heitman, J.** (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* **21**: 3179-3191.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C.** (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* **270**: 30157-30161.
- Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., and Olszewski, M.A.** (2013) Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* **4**: e00264-00213.

Referencias

- Decken, K., Kohler, G., Palmer-Lehmann, K., Wunderlin, A., Mattner, F., Magram, J., et al.** (1998) Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **66**: 4994-5000.
- Del Palacio, A., Villar, J., and Alhambra, A.** (2009) [Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations]. *Rev Iberoam Micol* **26**: 2-7.
- Del Poeta, M.** (2004) Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1067-1075.
- Del Poeta, M., and Mcquiston, T.** (2011) The Interaction of *Cryptococcus neoformans* with Host Macrophages and Neutrophils. In: *Cryptococcus. From Human Pathogen to Model Yeast*. Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, J., Perfect, J., and Casadevall, A. (eds). Washington: American Society for Microbiology, pp.
- Deshaw, M., and Pirofski, L.A.** (1995) Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. *Clin Exp Immunol* **99**: 425-432.
- Diamond, R.D., and Bennett, J.E.** (1973) Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. *Infect Immun* **7**: 231-236.
- Diamond, R.D., and Bennett, J.E.** (1974) Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Ann Intern Med* **80**: 176-181.
- Diamond, R.D., May, J.E., Kane, M.A., Frank, M.M., and Bennett, J.E.** (1974) The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **112**: 2260-2270.
- Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B., and Matagne, R.F.** (2001) Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **39**: 101-108.
- Doering, T.L.** (2009) How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* **63**: 223-247.
- Dromer, F., Mathoulin-Pelissier, S., Launay, O., and Lortholary, O.** (2007) Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med* **4**: e21.
- Dromer, F., Salamero, J., Contrepois, A., Carbon, C., and Yeni, P.** (1987) Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect Immun* **55**: 742-748.
- Dykstra, M.A., Friedman, L., and Murphy, J.W.** (1977) Capsule size of *Cryptococcus neoformans*: control and relationship to virulence. *Infect Immun* **16**: 129-135.
- Ellerbroek, P.M., Hoepelman, A.I., Wolbers, F., Zwaginga, J.J., and Coenjaerts, F.E.** (2002) Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium in vitro by affecting both neutrophils and endothelial cells. *Infect Immun* **70**: 4762-4771.
- Ellerbroek, P.M., Lefeber, D.J., van Veghel, R., Scharringa, J., Brouwer, E., Gerwig, G.J., et al.** (2004) O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. *J Immunol* **173**: 7513-7520.

- Emmons, C.W., and Jellison, W.L.** (1960) *Emmonsia crescens* sp. n. and adiaspiromycosis (haplomycosis) in mammals. *Ann N Y Acad Sci* **89**: 91-101.
- Evans, E.E.** (1949) An immunologic comparison of 12 strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). *Proc Soc Exp Biol Med* **71**: 644-646.
- Evans, R.J., Li, Z., Hughes, W.S., Djordjevic, J.T., Nielsen, K., and May, R.C.** (2015) Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infect Immun* **83**: 1296-1304.
- Farhi, F., Bulmer, G.S., and Tacker, J.R.** (1970) *Cryptococcus neoformans* IV. The Not-So-Encapsulated Yeast. *Infect Immun* **1**: 526-531.
- Feldmesser, M., Kress, Y., and Casadevall, A.** (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* **147**: 2355-2365.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., and Casadevall, A.** (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* **68**: 4225-4237.
- Feldmesser, M., Mednick, A., and Casadevall, A.** (2002) Antibody-mediated protection in murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotrophic effects on cytokine and leukocyte responses. *Infect Immun* **70**: 1571-1580.
- Fidel, P.L., Jr., Luo, W., Steele, C., Chabain, J., Baker, M., and Wormley, F., Jr.** (1999) Analysis of vaginal cell populations during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **67**: 3135-3140.
- Finkel, J.S., and Mitchell, A.P.** (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **9**: 109-118.
- Fleuridor, R., Zhong, Z., and Pirofski, L.** (1998) A human IgM monoclonal antibody prolongs survival of mice with lethal cryptococcosis. *J Infect Dis* **178**: 1213-1216.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F., and Casadevall, A.** (1999) *Cryptococcus neoformans* var. grubii: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* **37**: 838-840.
- Fraser, J.A., Subaran, R.L., Nichols, C.B., and Heitman, J.** (2003) Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryot Cell* **2**: 1036-1045.
- Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Viana, N.B., Rodrigues, M.L., and Casadevall, A.** (2009) Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1228-1233.
- Friedman, G.D., Jeffrey Fessel, W., Udaltsova, N.V., and Hurley, L.B.** (2005) Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses* **48**: 122-125.
- Galgiani, J.N.** (1999) Coccidioidomycosis: a regional disease of national importance. Rethinking approaches for control. *Ann Intern Med* **130**: 293-300.
- Gancedo, J.M.** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-361.

Referencias

- Garcia-Hermoso, D., Dromer, F., and Janbon, G.** (2004) *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection. *Infect Immun* **72**: 3359-3365.
- Garcia-Rodas, R., Casadevall, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., and Zaragoza, O.** (2011) *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* **6**: e24485.
- Garcia-Rodas, R., Cordero, R.J., Trevijano-Contador, N., Janbon, G., Moyrand, F., Casadevall, A., and Zaragoza, O.** (2014) Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *MBio* **5**: e00945-00914.
- Garcia-Rodas, R., and Zaragoza, O.** (2012) Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**: 147-161.
- Gates, M.A., and Kozel, T.R.** (2006) Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **74**: 3096-3106.
- Gates, M.A., Thorkildson, P., and Kozel, T.R.** (2004) Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* **52**: 13-24.
- Gazzoni, A.F., Oliveira Fde, M., Salles, E.F., Mayayo, E., Guarro, J., Capilla, J., and Severo, L.C.** (2010) Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **52**: 145-149.
- Gerstein, A.C., Fu, M.S., Mukaremera, L., Li, Z., Ormerod, K.L., Fraser, J.A., et al.** (2015) Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. *MBio* **6**: e01340-01315.
- Gessner, M.A., Werner, J.L., Lilly, L.M., Nelson, M.P., Metz, A.E., Dunaway, C.W., et al.** (2012) Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **80**: 410-417.
- Ghannoum, M.A.** (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143, table of contents.
- Ghosh, S., Navarathna, D.H., Roberts, D.D., Cooper, J.T., Atkin, A.L., Petro, T.M., and Nickerson, K.W.** (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun* **77**: 1596-1605.
- Gow, N.A.** (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* **8**: 43-55.
- Granger, D.L., Perfect, J.R., and Durack, D.T.** (1985) Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* **76**: 508-516.
- Grebien, F., Dolznig, H., Beug, H., and Mullner, E.W.** (2005) Cell size control: new evidence for a general mechanism. *Cell Cycle* **4**: 418-421.
- Griffiths, E.J., Hu, G., Fries, B., Caza, M., Wang, J., Gsponer, J., et al.** (2012) A defect in ATP-citrate lyase links acetyl-CoA production, virulence factor elaboration and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **86**: 1404-1423.

- Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., et al.** (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**: 1172-1177.
- Guillot, L., Carroll, S.F., Homer, R., and Qureshi, S.T.** (2008) Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. *Infect Immun* **76**: 4745-4756.
- Guimaraes, A.J., Frases, S., Cordero, R.J., Nimrichter, L., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D.** (2010) *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. *Cell Microbiol* **12**: 740-753.
- Guinea, J.** (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* **20 Suppl 6**: 5-10.
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., et al.** (2015) Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* **78**: 16-48.
- Hardison, S.E., Wozniak, K.L., Kolls, J.K., and Wormley, F.L., Jr.** (2010) Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* **78**: 5341-5351.
- Hase, C.C., and Finkelstein, R.A.** (1993) Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* **57**: 823-837.
- Haynes, B.C., Skowrya, M.L., Spencer, S.J., Gish, S.R., Williams, M., Held, E.P., et al.** (2011) Toward an integrated model of capsule regulation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **7**: e1002411.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., and Jacoby, J.J.** (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**: 671-680.
- Heiss, C., Skowrya, M.L., Liu, H., Klutts, J.S., Wang, Z., Williams, M., et al.** (2013) Unusual galactofuranose modification of a capsule polysaccharide in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **288**: 10994-11003.
- Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, K.J., Perferct, J.R., and Casadevall, A.** (2011) *Cryptococcus. From Human pathogen to model yeast*, p. 620. Washington DC: ASM Press.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.
- Herweijer, M.A., Berden, J.A., Kemp, A., and Slater, E.C.** (1985) Inhibition of energy-transducing reactions by 8-nitreno-ATP covalently bound to bovine heart submitochondrial particles: direct interaction between ATPase and redox enzymes. *Biochim Biophys Acta* **809**: 81-89.
- Hill, J.O., and Aguirre, K.M.** (1994) CD4+ T cell-dependent acquired state of immunity that protects the brain against *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **152**: 2344-2350.

Referencias

- Hill, J.O., and Harmsen, A.G. (1991) Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J Exp Med* **173**: 755-758.
- Hoag, K.A., Lipscomb, M.F., Izzo, A.A., and Street, N.E. (1997) IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 733-739.
- Hoag, K.A., Street, N.E., Huffnagle, G.B., and Lipscomb, M.F. (1995) Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**: 487-495.
- Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., et al. (2009) Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**: 1695-1703.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., et al. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.
- Hu, G., Cheng, P.Y., Sham, A., Perfect, J.R., and Kronstad, J.W. (2008) Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Mol Microbiol* **69**: 1456-1475.
- Hu, G., Steen, B.R., Lian, T., Sham, A.P., Tam, N., Tangen, K.L., and Kronstad, J.W. (2007) Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **3**: e42.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J., and Gow, N.A. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**: 87-99.
- Huffnagle, G.B., Lipscomb, M.F., Lovchik, J.A., Hoag, K.A., and Street, N.E. (1994) The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 35-42.
- Huffnagle, G.B., and McNeil, L.K. (1999) Dissemination of *C. neoformans* to the central nervous system: role of chemokines, Th1 immunity and leukocyte recruitment. *J Neurovirol* **5**: 76-81.
- Huffnagle, G.B., Yates, J.L., and Lipscomb, M.F. (1991) T cell-mediated immunity in the lung: a *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection model using SCID and athymic nude mice. *Infect Immun* **59**: 1423-1433.
- Hwang, L.H., Mayfield, J.A., Rine, J., and Sil, A. (2008) *Histoplasma* requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. *PLoS Pathog* **4**: e1000044.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., et al. (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 1993-1998.
- Igel, H.J., and Bolande, R.P. (1966) Humoral defense mechanisms in cryptococcosis: substances in normal human serum, saliva, and cerebrospinal fluid affecting the growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* **116**: 75-83.

- Iliev, I.D., Funari, V.A., Taylor, K.D., Nguyen, Q., Reyes, C.N., Strom, S.P., et al.** (2012) Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* **336**: 1314-1317.
- Izadpanah, A., and Gallo, R.L.** (2005) Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* **52**: 381-390; quiz 391-382.
- Jacobson, E.S., Tingler, M.J., and Quynn, P.L.** (1989) Effect of hypertonic solutes upon the polysaccharide capsule in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* **32**: 14-23.
- Janbon, G., Himmelreich, U., Moyrand, F., Improvisi, L., and Dromer, F.** (2001) Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* **42**: 453-467.
- Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Byrnes, E.J., 3rd, Yadav, V., Chatterjee, G., et al.** (2014) Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet* **10**: e1004261.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.** (2005) *ImmunoBiology. The immune system in health and disease*. Oxon, UK: Garland Science Publishing.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L., Michejda, J., and Sluse, F.E.** (1998) Electron partitioning between the two branching quinol-oxidizing pathways in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria during steady-state state 3 respiration. *J Biol Chem* **273**: 10174-10180.
- Jarvis, J.N., Casazza, J.P., Stone, H.H., Meintjes, G., Lawn, S.D., Levitz, S.M., et al.** (2013) The phenotype of the *Cryptococcus*-specific CD4+ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* **207**: 1817-1828.
- Johnson, C.H., Prigge, J.T., Warren, A.D., and McEwen, J.E.** (2003) Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast* **20**: 381-388.
- Jong, A., Wu, C.H., Chen, H.M., Luo, F., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y.C., et al.** (2007) Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell* **6**: 1486-1496.
- Jongwutiwes, U., Kiertiburanakul, S., and Sungkanuparph, S.** (2007) Impact of antiretroviral therapy on the relapse of cryptococcosis and survival of HIV-infected patients with cryptococcal infection. *Curr HIV Res* **5**: 355-360.
- Jung, W.H., and Kronstad, J.W.** (2011) Iron influences the abundance of the iron regulatory protein Cir1 in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Lett* **585**: 3342-3347.
- Kagami, S., Rizzo, H.L., Kurtz, S.E., Miller, L.S., and Blauvelt, A.** (2010) IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J Immunol* **185**: 5453-5462.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E.** (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* **9**: 1559-1571.

Referencias

- Kawakami, K., Qifeng, X., Tohyama, M., Qureshi, M.H., and Saito, A.** (1996) Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* **106**: 468-474.
- Kawakami, K., Qureshi, M.H., Zhang, T., Koguchi, Y., Shibuya, K., Naoe, S., and Saito, A.** (1999) Interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent protection and synthesis of chemoattractants for mononuclear leucocytes caused by IL-12 in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* **117**: 113-122.
- Kayikci, O., and Nielsen, J.** (2015) Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **15**.
- Kechichian, T.B., Shea, J., and Del Poeta, M.** (2007) Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun* **75**: 4792-4798.
- Kerscher, S.J.** (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 274-283.
- Kidd, S.E., Hagen, F., Tschärke, R.L., Huynh, M., Bartlett, K.H., Fyfe, M., et al.** (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17258-17263.
- Kim, K.S.** (2006) Microbial translocation of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **36**: 607-614.
- Kim, K.S.** (2008) Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* **6**: 625-634.
- Kirimura, K., Yoda, M., and Usami, S.** (1999) Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr Genet* **34**: 472-477.
- Klein, B.S., and Tebbets, B.** (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol* **10**: 314-319.
- Kleinschek, M.A., Muller, U., Brodie, S.J., Stenzel, W., Kohler, G., Blumenschein, W.M., et al.** (2006) IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol* **176**: 1098-1106.
- Klutts, J.S., and Doering, T.L.** (2008) Cryptococcal xylosyltransferase 1 (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* plays a direct role in the synthesis of capsule polysaccharides. *J Biol Chem* **283**: 14327-14334.
- Koguchi, Y., and Kawakami, K.** (2002) Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol* **21**: 423-438.
- Kolls, J.K., and Linden, A.** (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**: 467-476.
- Kolls, J.K., McCray, P.B., Jr., and Chan, Y.R.** (2008) Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* **8**: 829-835.

- Kozel, T.R., Gulley, W.F., and Cazin, J., Jr.** (1977) Immune response to *Cryptococcus neoformans* soluble polysaccharide: immunological unresponsiveness. *Infect Immun* **18**: 701-707.
- Kozel, T.R., Levitz, S.M., Dromer, F., Gates, M.A., Thorkildson, P., and Janbon, G.** (2003) Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun* **71**: 2868-2875.
- Kozel, T.R., Pfrommer, G.S., and Redelman, D.** (1987) Activated neutrophils exhibit enhanced phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* opsonized with normal human serum. *Clin Exp Immunol* **70**: 238-246.
- Kozubowski, L., and Heitman, J.** (2012) Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 78-94.
- Kumar, P., Yang, M., Haynes, B.C., Skowrya, M.L., and Doering, T.L.** (2011) Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 597-602.
- Kwon-Chung, K.B., T; Wickes, BL; Fell, JW** (2011) Systematics of the Genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: *Cryptococcus. From human pathogen to model yeast*. Joseph Heitman, T.R.K., Kyung J Kwon-Chung, John R Perferct, and Arturo Casadevall (ed). Washington: ASM, pp. 3-15.
- Kwon-Chung, K.J.** (1976) Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **68**: 821-833.
- Kwon-Chung, K.J., Lehman, D., Good, C., and Magee, P.T.** (1985) Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **49**: 571-575.
- Kwon-Chung, K.J., and Varma, A.** (2006) Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* **6**: 574-587.
- Lagasse, E., and Clerc, R.G.** (1988) Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* **8**: 2402-2410.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L.** (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357-359.
- Lass-Flörl, C., Roilides, E., Löffler, J., Wilflingseder, D., and Romani, L.** (2013) Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* **56**: 403-413.
- Latge, J.P., and Steinbach, W.** (2009) *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Washington D.C.: ASM Press.
- Lazera, M.S., Salmito Cavalcanti, M.A., Londero, A.T., Trilles, L., Nishikawa, M.M., and Wanke, B.** (2000) Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* **38**: 379-383.
- Lee, S.C., Kress, Y., Zhao, M.L., Dickson, D.W., and Casadevall, A.** (1995) *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. *Lab Invest* **73**: 871-879.

Referencias

- Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A.** (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**: 2271-2279.
- Lin, J., Idnurm, A., and Lin, X.** (2015) Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between *Cryptococcus neoformans* and its hosts. *Med Mycol* **53**: 493-504.
- Lindell, D.M., Moore, T.A., McDonald, R.A., Toews, G.B., and Huffnagle, G.B.** (2005) Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **174**: 7920-7928.
- Lindsay, A.K., Deveau, A., Piispanen, A.E., and Hogan, D.A.** (2012) Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 1219-1225.
- Lipovsky, M.M., Tsenova, L., Coenjaerts, F.E., Kaplan, G., Cherniak, R., and Hoepelman, A.I.** (2000) Cryptococcal glucuronoxylomannan delays translocation of leukocytes across the blood-brain barrier in an animal model of acute bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* **111**: 10-14.
- Littman, M.L.** (1958) Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Trans N Y Acad Sci* **20**: 623-648.
- Liu, L., Tewari, R.P., and Williamson, P.R.** (1999) Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* **67**: 6034-6039.
- Liu, O.W., Chun, C.D., Chow, E.D., Chen, C., Madhani, H.D., and Noble, S.M.** (2008) Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* **135**: 174-188.
- Liu, O.W., Kelly, M.J., Chow, E.D., and Madhani, H.D.** (2007) Parallel beta-helix proteins required for accurate capsule polysaccharide synthesis and virulence in the yeast *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **6**: 630-640.
- Lortholary, O., Poizat, G., Zeller, V., Neuville, S., Boibieux, A., Alvarez, M., et al.** (2006) Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids* **20**: 2183-2191.
- Love, G.L., Boyd, G.D., and Greer, D.L.** (1985) Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* **22**: 1068-1070.
- Ma, H., Croudace, J.E., Lammas, D.A., and May, R.C.** (2006) Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* **16**: 2156-2160.
- Ma, L.L., Spurrell, J.C., Wang, J.F., Neely, G.G., Epelman, S., Krensky, A.M., and Mody, C.H.** (2002) CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol* **169**: 5787-5795.
- Macher, A.M., Bennett, J.E., Gadek, J.E., and Frank, M.M.** (1978) Complement depletion in cryptococcal sepsis. *J Immunol* **120**: 1686-1690.

- Magditch, D.A., Liu, T.B., Xue, C., and Idnurm, A.** (2012) DNA mutations mediate microevolution between host-adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **8**: e1002936.
- Maitta, R.W., Datta, K., Chang, Q., Luo, R.X., Witover, B., Subramaniam, K., and Pirofski, L.A.** (2004) Protective and nonprotective human immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan manifest different specificities and gene use profiles. *Infect Immun* **72**: 4810-4818.
- Mambula, S.S., Simons, E.R., Hastey, R., Selsted, M.E., and Levitz, S.M.** (2000) Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **68**: 6257-6264.
- Mansour, M.K., and Levitz, S.M.** (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 359-365.
- Marais, S., Meintjes, G., Lesosky, M., Wilkinson, K.A., and Wilkinson, R.J.** (2016) Interleukin-17 mediated differences in the pathogenesis of HIV-1-associated tuberculous and cryptococcal meningitis. *AIDS* **30**: 395-404.
- Martin, T.R., and Frevert, C.W.** (2005) Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* **2**: 403-411.
- Maxson, M.E., Cook, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O.** (2007a) The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol* **44**: 180-186.
- Maxson, M.E., Dadachova, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O.** (2007b) Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell* **6**: 95-109.
- Mayer, F.L., Wilson, D., and Hube, B.** (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**: 119-128.
- McAleer, J.P., and Kolls, J.K.** (2014) Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev* **260**: 129-144.
- McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., et al.** (2010) NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* **12**: 928-936.
- McFadden, D.C., and Casadevall, A.** (2001) Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 19-30.
- McFadden, D.C., De Jesus, M., and Casadevall, A.** (2006) The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem* **281**: 1868-1875.
- McFadden, D.C., Fries, B.C., Wang, F., and Casadevall, A.** (2007) Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **6**: 1464-1473.
- McKenzie, C.G., Koser, U., Lewis, L.E., Bain, J.M., Mora-Montes, H.M., Barker, R.N., et al.** (2010) Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun* **78**: 1650-1658.

Referencias

- McQuiston, T.J., and Williamson, P.R.** (2012) Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Chemother* **18**: 1-9.
- Mednick, A.J., Feldmesser, M., Rivera, J., and Casadevall, A.** (2003) Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *Eur J Immunol* **33**: 1744-1753.
- Miceli, M.H., Diaz, J.A., and Lee, S.A.** (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* **11**: 142-151.
- Milam, J.E., Herring-Palmer, A.C., Pandrangi, R., McDonald, R.A., Huffnagle, G.B., and Toews, G.B.** (2007) Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to *Cryptococcus neoformans* by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector. *Infect Immun* **75**: 4951-4958.
- Miller, M.F., and Mitchell, T.G.** (1991) Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. *Infect Immun* **59**: 24-28.
- Mirza, S.A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M.E., et al.** (2003) The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis* **36**: 789-794.
- Mitchell, T.G., and Friedman, L.** (1972) In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **5**: 491-498.
- Mody, C.H., Chen, G.H., Jackson, C., Curtis, J.L., and Toews, G.B.** (1994) In vivo depletion of murine CD8 positive T cells impairs survival during infection with a highly virulent strain of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **125**: 7-17.
- Mody, C.H., Lipscomb, M.F., Street, N.E., and Toews, G.B.** (1990) Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defense to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **144**: 1472-1477.
- Mogensen, E.G., Janbon, G., Chaloupka, J., Steegborn, C., Fu, M.S., Moyrand, F., et al.** (2006) *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell* **5**: 103-111.
- Monga, D.P., Kumar, R., Mohapatra, L.N., and Malaviya, A.N.** (1979) Experimental cryptococcosis in normal and B-cell-deficient mice. *Infect Immun* **26**: 1-3.
- Moore, A.L., and Siedow, J.N.** (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1059**: 121-140.
- Mosci, P., Gabrielli, E., Luciano, E., Perito, S., Cassone, A., Pericolini, E., and Vecchiarelli, A.** (2014) Involvement of IL-17A in preventing the development of deep-seated candidiasis from oropharyngeal infection. *Microbes Infect* **16**: 678-689.
- Moyes, D.L., Wilson, D., Richardson, J.P., Mogavero, S., Tang, S.X., Wernecke, J., et al.** (2016) Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*.

- Moyrand, F., Chang, Y.C., Himmelreich, U., Kwon-Chung, K.J., and Janbon, G.** (2004) Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot Cell* **3**: 1513-1524.
- Mukherjee, J., Kozel, T.R., and Casadevall, A.** (1998) Monoclonal antibodies reveal additional epitopes of serotype D *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan that elicit protective antibodies. *J Immunol* **161**: 3557-3568.
- Mukherjee, J., Pirofski, L.A., Scharff, M.D., and Casadevall, A.** (1993) Antibody-mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3636-3640.
- Mukherjee, J., Scharff, M.D., and Casadevall, A.** (1992) Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **60**: 4534-4541.
- Muller, U., Stenzel, W., Kohler, G., Werner, C., Polte, T., Hansen, G., et al.** (2007) IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **179**: 5367-5377.
- Murphy, J.W., and Cozad, G.C.** (1972) Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. *Infect Immun* **5**: 896-901.
- Mylonakis, E., Ausubel, F.M., Perfect, J.R., Heitman, J., and Calderwood, S.B.** (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15675-15680.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J.B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S.B., et al.** (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* **73**: 3842-3850.
- Naglik, J.R., Moyes, D.L., Wachtler, B., and Hube, B.** (2011) *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* **13**: 963-976.
- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., et al.** (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**: 375-387.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W.** (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
- Neilson, J.B., Ivey, M.H., and Bulmer, G.S.** (1978) *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* **20**: 262-266.
- Neofytos, D., Horn, D., Anaissie, E., Steinbach, W., Olyaei, A., Fishman, J., et al.** (2009) Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**: 265-273.
- Nielsen, K., Cox, G.M., Wang, P., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., and Heitman, J.** (2003) Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect Immun* **71**: 4831-4841.

Referencias

- Nobile, C.J., and Johnson, A.D.** (2015) *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* **69**: 71-92.
- Noverr, M.C., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B.** (2003) Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect Immun* **71**: 1538-1547.
- Noverr, M.C., Williamson, P.R., Fajardo, R.S., and Huffnagle, G.B.** (2004) CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect Immun* **72**: 1693-1699.
- O'Meara, T.R., and Alspaugh, J.A.** (2012) The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev* **25**: 387-408.
- Odds, F.C.** (1984) Ecology and epidemiology of *Candida* species. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* **257**: 207-212.
- Odink, K., Cerletti, N., Bruggen, J., Clerc, R.G., Tarcsay, L., Zwadlo, G., et al.** (1987) Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**: 80-82.
- Ogita, K., Miyamoto, S., Koide, H., Iwai, T., Oka, M., Ando, K., et al.** (1990) Protein kinase C in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with the mammalian enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5011-5015.
- Okagaki, L.H., and Nielsen, K.** (2012) Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryot Cell* **11**: 820-826.
- Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Charlier, C., Baltes, N.J., Chretien, F., et al.** (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* **6**: e1000953.
- Okagaki, L.H., Wang, Y., Ballou, E.R., O'Meara, T.R., Bahn, Y.S., Alspaugh, J.A., et al.** (2011) Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. *Eukaryot Cell* **10**: 1306-1316.
- Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Rodrigues, M.L., and Nimrichter, L.** (2010) Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* **78**: 1601-1609.
- Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G.H., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B.** (2004) Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* **164**: 1761-1771.
- Osterholzer, J.J., Surana, R., Milam, J.E., Montano, G.T., Chen, G.H., Sonstein, J., et al.** (2009) Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol* **174**: 932-943.
- Otsubo, Y., and Yamamoto, M.** (2008) TOR signaling in fission yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 277-283.
- Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., and Chiller, T.M.** (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**: 525-530.

- Parmely, M.J.** (1992) *Pseudomonas* metalloproteases and the host-microbe relationship In: *Pseudomonas aeruginosa, the opportunist : pathogenesis and disease*. Robert B. Fick, J. (ed). Iowa City, Iowa: Boca Raton : CRC Press, pp. 79-94.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N., Jr.** (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**: 291-300.
- Perfect, J.R.** (2005) *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**: 395-404.
- Pettinato, G., Manivel, J.C., Petrella, G., and De Chiara, A.** (1991) Primary multilobated T-cell lymphoma of the breast diagnosed by fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry. *Acta Cytol* **35**: 294-299.
- Pfaffl, M.W.** (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: *A-Z of quantitative PCR* Bustin, S.A. (ed). La Jolla, CA: International University Line (IUL) pp.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J.** (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Pfuller, R., Graser, Y., Erhard, M., and Groenewald, M.** (2011) A novel flucytosine-resistant yeast species, *Candida pseudoaaseri*, causes disease in a cancer patient. *J Clin Microbiol* **49**: 4195-4202.
- Phan, Q.T., Fratti, R.A., Prasadarao, N.V., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G.** (2005) N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem* **280**: 10455-10461.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., et al.** (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**: e64.
- Pierini, L.M., and Doering, T.L.** (2001) Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **41**: 105-115.
- Pirofski, L.A.** (2006) Of mice and men, revisited: new insights into an ancient molecule from studies of complement activation by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **74**: 3079-3084.
- Pirofski, L.A., and Casadevall, A.** (2002) The meaning of microbial exposure, infection, colonisation, and disease in clinical practice. *Lancet Infect Dis* **2**: 628-635.
- Polke, M., Hube, B., and Jacobsen, I.D.** (2015) *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol* **91**: 139-235.
- Puig-Asensio, M., Padilla, B., Garnacho-Montero, J., Zaragoza, O., Aguado, J.M., Zaragoza, R., et al.** (2014) Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* **20**: O245-254.
- Qiu, Y., Dayrit, J.K., Davis, M.J., Carolan, J.F., Osterholzer, J.J., Curtis, J.L., and Olszewski, M.A.** (2013) Scavenger receptor A modulates the immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **191**: 238-248.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I.** (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**: 261-267.

Referencias

- Rhodes, J.C., Wicker, L.S., and Urba, W.J.** (1980) Genetic control of susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in mice. *Infect Immun* **29**: 494-499.
- Rivera, J., and Casadevall, A.** (2005) Mouse genetic background is a major determinant of isotype-related differences for antibody-mediated protective efficacy against *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **174**: 8017-8026.
- Robert, V., Cardinali, G., and Casadevall, A.** (2015) Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. *BMC Biol* **13**: 18.
- Robert, V.A., and Casadevall, A.** (2009) Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis* **200**: 1623-1626.
- Robertson, E.J., Najjuka, G., Rolfes, M.A., Akampurira, A., Jain, N., Anantharanjit, J., et al.** (2014) *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* **209**: 74-82.
- Rodrigues, M.L., Alvarez, M., Fonseca, F.L., and Casadevall, A.** (2008a) Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* **7**: 602-609.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A.** (2008b) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58-67.
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., et al.** (2007) Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* **6**: 48-59.
- Rohatgi, S., and Pirofski, L.A.** (2012) Molecular characterization of the early B cell response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **189**: 5820-5830.
- Rohatgi, S., and Pirofski, L.A.** (2015) Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol* **10**: 565-581.
- Rooney, P.J., and Klein, B.S.** (2004) Sequence elements necessary for transcriptional activation of BAD1 in the yeast phase of *Blastomyces dermatitidis*. *Eukaryot Cell* **3**: 785-794.
- Rosas, A.L., and Casadevall, A.** (1997) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 265-272.
- Rueping, M.J., Vehreschild, J.J., and Cornely, O.A.** (2009) Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 735-748.
- Rutitzky, L.I., Bazzone, L., Shainheit, M.G., Joyce-Shaikh, B., Cua, D.J., and Stadecker, M.J.** (2008) IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J Immunol* **180**: 2486-2495.

- Ruy, F., Vercesi, A.E., and Kowaltowski, A.J.** (2006) Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr* **38**: 129-135.
- Sakajo, S., Minagawa, N., and Yoshimoto, A.** (1993) Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* **318**: 310-312.
- Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., and Williamson, P.R.** (1996) Effect of the laccase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* **184**: 377-386.
- Sanford, J.E., Lupan, D.M., Schlageter, A.M., and Kozel, T.R.** (1990) Passive immunization against *Cryptococcus neoformans* with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* **58**: 1919-1923.
- Sanglard, D., Ischer, F., and Bille, J.** (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1174-1183.
- Schmelzle, T., and Hall, M.N.** (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-262.
- Schmiel, D.H., and Miller, V.L.** (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* **1**: 1103-1112.
- Shao, X., Mednick, A., Alvarez, M., van Rooijen, N., Casadevall, A., and Goldman, D.L.** (2005) An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J Immunol* **175**: 3244-3251.
- Shapiro, S., Beenhouwer, D.O., Feldmesser, M., Taborda, C., Carroll, M.C., Casadevall, A., and Scharff, M.D.** (2002) Immunoglobulin G monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* protect mice deficient in complement component C3. *Infect Immun* **70**: 2598-2604.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., and Azeredo, J.** (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 288-305.
- Simonetti, N., Strippoli, V., and Cassone, A.** (1974) Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* **250**: 344-346.
- Singh, N., Dromer, F., Perfect, J.R., and Lortholary, O.** (2008) Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin Infect Dis* **47**: 1321-1327.
- Smith, L.M., Dixon, E.F., and May, R.C.** (2015) The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell Microbiol* **17**: 702-713.
- Sobel, J.D.** (2007) Vulvovaginal candidosis. *Lancet* **369**: 1961-1971.
- Sobel, J.D., Muller, G., and Buckley, H.R.** (1984) Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun* **44**: 576-580.

Referencias

- Sorrell, T.C.** (2001) *Cryptococcus neoformans* variety gattii. *Med Mycol* **39**: 155-168.
- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., and Sundstrom, P.** (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.
- Staib, F., Thielke, C., Randhawa, H.S., Senska, M., and Kulins, G.** (1972) Colonisation of dead plants by *Cryptococcus neoformans*. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **222**: 115-125.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K.** (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**: 285-294.
- Stephen, C., Lester, S., Black, W., Fyfe, M., and Raverty, S.** (2002) Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J* **43**: 792-794.
- Subramaniam, K., Metzger, B., Hanau, L.H., Guh, A., Rucker, L., Badri, S., and Pirofski, L.A.** (2009) IgM(+) memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis status. *J Infect Dis* **200**: 244-251.
- Subramaniam, K.S., Datta, K., Marks, M.S., and Pirofski, L.A.** (2010a) Improved survival of mice deficient in secretory immunoglobulin M following systemic infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **78**: 441-452.
- Subramaniam, K.S., Datta, K., Quintero, E., Manix, C., Marks, M.S., and Pirofski, L.A.** (2010b) The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **184**: 5755-5767.
- Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J.** (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sudbery, P.E.** (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**: 737-748.
- Sugimoto-Shirasu, K., and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 544-553.
- Sundstrom, P., Balish, E., and Allen, C.M.** (2002) Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis* **185**: 521-530.
- Szymczak, W.A., Davis, M.J., Lundy, S.K., Dufaud, C., Olszewski, M., and Pirofski, L.A.** (2013) X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio* **4**: e00265-00213.
- Taborda, C.P., Rivera, J., Zaragoza, O., and Casadevall, A.** (2003) More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. *J Immunol* **170**: 3621-3630.
- Taschdjian, C.L., Burchall, J.J., and Kozinn, P.J.** (1960) Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA J Dis Child* **99**: 212-215.

- Todaro-Luck, F., Reiss, E., Cherniak, R., and Kaufman, L.** (1989) Characterization of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan polysaccharide with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **57**: 3882-3887.
- Trevijano-Contador, N., and Zaragoza, O.** (2014) Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. *Virulence* **5**: 454-456.
- Tucker, S.C., and Casadevall, A.** (2002) Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3165-3170.
- Turner, S.A., and Butler, G.** (2014) The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a019778.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., et al.** (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**: e1000639.
- Vaishnav, V.V., Bacon, B.E., O'Neill, M., and Cherniak, R.** (1998) Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr Res* **306**: 315-330.
- van Asbeck, E.C., Hoepelman, A.I., Scharringa, J., Herpers, B.L., and Verhoef, J.** (2008) Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. *BMC Microbiol* **8**: 229.
- van de Moer, A., Salhi, S.L., Cherniak, R., Pau, B., Garrigues, M.L., and Bastide, J.M.** (1990) An anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody directed against galactoxylomannan. *Res Immunol* **141**: 33-42.
- van de Veerdonk, F.L., and Netea, M.G.** (2010) T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep* **4**: 238-243.
- Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J., and Jacobson, E.S.** (1993) Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* **167**: 186-190.
- Vecchiarelli, A.** (2000) Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* **38**: 407-417.
- Vecchiarelli, A., Dottorini, M., Pietrella, D., Monari, C., Retini, C., Todisco, T., and Bistoni, F.** (1994) Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 130-137.
- Velagapudi, R., Hsueh, Y.P., Geunes-Boyer, S., Wright, J.R., and Heitman, J.** (2009) Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 4345-4355.
- Venn-Watson, S., Daniels, R., and Smith, C.** (2012) Thirty year retrospective evaluation of pneumonia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population. *Dis Aquat Organ* **99**: 237-242.

Referencias

- Wachtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., and Hube, B.** (2011) From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* **6**: e17046.
- Wang, J.M., Zhou, Q., Cai, H.R., Zhuang, Y., Zhang, Y.F., Xin, X.Y., et al.** (2014) Clinicopathological features of pulmonary cryptococcosis with cryptococcal titan cells: a comparative analysis of 27 cases. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 4837-4846.
- Wang, X.** (2009) A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *RNA* **15**: 716-723.
- Wang, Y., and Casadevall, A.** (1994) Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* **62**: 3004-3007.
- Warnock, D.W.** (2007) Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**: 1-12.
- Warnock, D.W., Burke, J., Cope, N.J., Johnson, E.M., von Fraunhofer, N.A., and Williams, E.W.** (1988) Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* **2**: 1310.
- Warpeha, K.M., Park, Y.D., and Williamson, P.R.** (2013) Susceptibility of intact germinating *Arabidopsis thaliana* to human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2979-2988.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L.** (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.
- Wilson, D.E., Bennett, J.E., and Bailey, J.W.** (1968) Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med* **127**: 820-823.
- Williamson, J.D., Silverman, J.F., Mallak, C.T., and Christie, J.D.** (1996) Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: a report of five cases. *Acta Cytol* **40**: 363-370.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., and Edmond, M.B.** (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R.** (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**: 241-254.
- Wollschlaeger, C., Trevijano-Contador, N., Wang, X., Legrand, M., Zaragoza, O., Heitman, J., and Janbon, G.** (2014) Distinct and redundant roles of exonucleases in *Cryptococcus neoformans*: Implications for virulence and mating. *Fungal Genet Biol* **73**: 20-28.
- Woods, J.P.** (2002) Dimorphism in Human Pathogens. In: *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*. Calderone, R.A., and Cihlar, R.L. (eds). New York: Marcel Dekker, Inc, pp. 99-113.
- Wozniak, K.L., Hardison, S.E., Kolls, J.K., and Wormley, F.L.** (2011) Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PLoS One* **6**: e17204.

- Wozniak, K.L., Hole, C.R., Yano, J., Fidel, P.L., Jr., and Wormley, F.L., Jr.** (2014) Characterization of IL-22 and antimicrobial peptide production in mice protected against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Microbiology* **160**: 1440-1452.
- Xue, C., Tada, Y., Dong, X., and Heitman, J.** (2007) The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* **1**: 263-273.
- Yike, I.** (2011) Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia* **171**: 299-323.
- Yuan, R., Casadevall, A., Spira, G., and Scharff, M.D.** (1995) Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to *Cryptococcus neoformans* into a protective antibody. *J Immunol* **154**: 1810-1816.
- Zaragoza, O., Alvarez, M., Telzak, A., Rivera, J., and Casadevall, A.** (2007) The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun* **75**: 2729-2739.
- Zaragoza, O., and Casadevall, A.** (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* **6**: 10-15.
- Zaragoza, O., and Casadevall, A.** (2006) Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance. *Cell Microbiol* **8**: 1862-1876.
- Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A.** (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* **10**: 2043-2057.
- Zaragoza, O., Fries, B.C., and Casadevall, A.** (2003a) Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun* **71**: 6155-6164.
- Zaragoza, O., Garcia-Rodas, R., Nosanchuk, J.D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A.** (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog* **6**: e1000945.
- Zaragoza, O., and Nielsen, K.** (2013) Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol* **16**: 409-413.
- Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A.** (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* **68**: 133-216.
- Zaragoza, O., Taborda, C.P., and Casadevall, A.** (2003b) The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol* **33**: 1957-1967.
- Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R.A., Dadachova, E., and Casadevall, A.** (2006) The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*

Referencias

- enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* **59**: 67-83.
- Zarzov, P., Mazzoni, C., and Mann, C.** (1996) The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J* **15**: 83-91.
- Zhai, B., Zhu, P., Foyle, D., Upadhyay, S., Idnurm, A., and Lin, X.** (2013) Congenic strains of the filamentous form of *Cryptococcus neoformans* for studies of fungal morphogenesis and virulence. *Infect Immun* **81**: 2626-2637.
- Zhang, Y., Wang, F., Tompkins, K.C., McNamara, A., Jain, A.V., Moore, B.B., et al.** (2009) Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* **175**: 2489-2500.
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., and Williamson, P.R.** (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* **69**: 5589-5596.
- Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Le Good, J.A., Whelan, R.D., Kelly, J.J., Frech, M., et al.** (1999) Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr Biol* **9**: 522-529.
- Zwadlo, G., Bruggen, J., Gerhards, G., Schlegel, R., and Sorg, C.** (1988) Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol* **72**: 510-515.

8. ANEXOS

PUBLICACIONES

8.1 Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens (Nuria Trevijano-Contador and Oscar Zaragoza). *Virulence*, May 15, 2014.

8.2 Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression (Rocío García-Rodas, Radames J.B. Cordero, Nuria Trevijano-Contador, Guilhem Janbon, Frédérique Moyrand, Arturo Casadevall, Oscar Zaragoza). *mBio*, June 17, 2014.

8.3 *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella* (Nuria Trevijano-Contador, Inés Herrero-Fernández, Irene García-Barbazán, Liliana Scorzoni, Cristina Rueda, Suélen Andreia Rossi, Rocío García-Rodas and Oscar Zaragoza). *Virulence*, December 1, 2014.

8.4 The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeast and contributes to the fungicidal effect of this drug (Ana Cecilia Mesa-Arango, Nuria Trevijano-Contador, Elvira Román, Ruth Sánchez-Fresneda, Celia Casas, Enrique Herrero, Juan Carlos Argüelles, Jesús Pla, Manuel Cuenca-Estrella, Oscar Zaragoza). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 31, 2014.

8.5 Distinct and redundant roles of exonucleases in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence and mating (Carolyn Wollschlaeger, Nuria Trevijano-Contador, Xuying Wang, Mélanie Legrand, Oscar Zaragoza, Joseph Heitman and Guilhem Janbon). *Fungal Genet Biol*, December, 2014.

8.6 The formation of titan cells in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses (Irene García-Barbazán, Nuria Trevijano-Contador, Cristina Rueda, Belén de Andrés, Raquel Pérez-Tavárez, Inés Herrero-Fernández, María Luisa Gaspar and Oscar Zaragoza). *Cellular Microbiology*, July 11, 2015.

8.7 Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans* (Rocío García-Rodas, Nuria Trevijano-Contador, Elvira Román, Guilhem Janbon, Frédérique Moyrand, Jesús Pla, Arturo Casadevall and Oscar Zaragoza). *Frontiers in Microbiology*, August 12, 2015.

8.8 Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates (Suélen A. Rosssi, Nuria Trevijano-Contador, Liliana Scorzoni, Ana Cecilia Mesa-Arango, Haroldo C. de Oliveira, Karin Werther, Tânia de Freitas Raso, Maria J. S. Mendes-Giannini, Oscar Zaragoza and Ana M. Fusco-Almeida). *Frontiers in Microbiology*, February, 2016.

8.9 Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host (Nuria Trevijano-Contador, Cristina Rueda, Oscar Zaragoza). *Seminars in Cell & inside the mammalian host*, April 15, 2016).

